



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1

sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Science de la Santé

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Delphine Méheust

Préparée à l'unité de recherche INSERM U1085-IRSET
Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail

Exposition aux moisissures
en environnement intérieur :
Méthodes de mesure et
Impacts sur la santé

**Thèse soutenue à Rennes
le 28 Novembre 2012**

devant le jury composé de :

Laurence MILLON

Professeur, Université de Besançon /
Rapporteur

Jacques GUILLOT

Professeur, Ecole nationale vétérinaire
d'Alfort, Université de Paris 12 / Rapporteur

Laurence DELHAES

Docteur, Université de Lille / Examineur

Jean-Pierre GANGNEUX

Professeur, Université de Rennes 1 / Directeur
de thèse

Pierre LE CANN

Docteur, Ecole de Hautes Etudes en Santé
Publique / Co-encadrant de thèse



THÈSE
UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne
et ECOLE DES HAUTES ETUDES EN SANTE PUBLIQUE

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie et Science de la Santé
Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par
Delphine Méheust

Préparée dans le cadre du Réseau Doctoral en Santé Publique
à l'unité de recherche INSERM U1085-IRSET
Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail



Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Je tiens en premier lieu à remercier chaleureusement mes deux encadrants de thèse, Pierre Le Cann et Jean-Pierre Gangneux. Je tiens à leur exprimer ma profonde gratitude pour leur confiance, leurs conseils avisés, leur grande disponibilité et leur bienveillance.

Je remercie sincèrement les membres de mon comité de thèse, Marie-Agnès Coutellec, Tiina Reponen, Georges Barbier, pour leur soutien et leurs précieux conseils.

Je remercie également Laurence Delhaes, Laurence Millon et Jacques Guillot pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance à Olivier Thomas et Denis Zmirou-Navier pour m'avoir accueillie au sein de leurs équipes à l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP), et pour leurs conseils constructifs tout au long de la thèse.

Un grand merci à tous les collègues du Laboratoire d'Etude et de Recherche en Environnement et Santé (LERES) et du département Santé Environnement Travail pour leur bonne humeur et leur gentillesse. Une pensée particulière à l'équipe de Microbiologie avec qui j'ai été ravie de travailler durant ces trois années.

Je tiens à remercier le service de Parasitologie-Mycologie, ainsi que les différents services du Centre Hospitalier Universitaire de Rennes qui ont contribué à la réalisation de ces travaux.

J'adresse également mes sincères remerciements au Réseau Doctoral de l'EHESP qui m'a permis de suivre des formations et d'acquérir des connaissances dans les champs disciplinaires de la santé publique. Cette thèse n'aurait pas été aussi riche d'expériences sans le soutien du Réseau.

J'associe à ces remerciements tous mes camarades de thèse du LERES, de l'association Ph'Doc, et du Club IRSET, pour les moments d'amitié que nous avons partagés.

Je tiens à remercier Pascale Meillier du service Santé Environnement de la ville de Rennes pour sa contribution dans le recrutement des logements, ainsi que toutes les personnes qui ont acceptées de participer à notre étude.

Mes remerciements vont également à Sophie Frain pour m'avoir fait partager son expérience et découvrir ses activités au sein de l'association Capt'air Bretagne.

Je suis très reconnaissante envers l'équipe du LUBEM, tout particulièrement Georges Barbier et Jean-Luc Jany, qui m'ont accompagnée dans mes premiers pas en recherche.

Thank you Tiina and Steve for your warm welcome in the University of Cincinnati and in EPA. It was a great pleasure to work in your team. Thanks again for your guidance and kindness.

Mes derniers remerciements iront à ma maman, ma famille et mes proches pour leur aide et leurs encouragements. Une forte pensée à la mémoire de mon grand-père. Et un grand merci à mon ami pour sa présence de tous les jours et son soutien dans cette aventure.

Sommaire

Remerciements	5
Lexique	9
Liste des abréviations	11
Liste des illustrations	13
Avant propos	15
Chapitre 1 : Introduction bibliographique	19
I. Moisissures et leurs effets sur la santé humaine	19
A. La classification et le cycle de vie des moisissures	19
B. L'écologie des moisissures en environnement intérieur	22
C. Les composantes fongiques potentiellement responsables d'effets cliniques	26
D. Les effets sur la santé associés aux moisissures	30
II. Problèmes de santé publique liés aux moisissures	33
A. Le risque fongique : de l'infection nosocomiale aux maladies professionnelles	33
B. Les effets sanitaires des moisissures dans l'habitat	36
III. Mesure de l'exposition fongique en environnement intérieur	40
A. Un constat majeur : Le besoin d'outils quantitatifs	40
B. Discussion sur les méthodes fréquemment utilisées	41
C. Revue critique de la littérature	42
Les objectifs	63
Résultats	65
Chapitre 2. Evaluation de la contamination microbienne de l'air par la méthode d'impaction sur gélose	67
Chapitre 3. Quantification de la flore fongique viable par cytométrie en phase solide	89
Chapitre 4. Evaluation d'un outil moléculaire pour l'étude de la contamination fongique des logements	113
Chapitre 5. Mesure de l'exposition aux moisissures dans l'environnement domiciliaire : comparaison de différentes méthodes de prélèvements et d'analyses	127
Discussion générale et Perspectives	139
Bibliographie	153
Annexe 1 : Communications orales	167
Annexe 2 : Communications affichées	175

Lexique

Allergène : toute substance capable d'entraîner une sensibilisation du système immunitaire et menant, lors des expositions subséquentes, à une réaction allergique et aux manifestations qui y sont associées.

Aspergillose : mycose provoquée par la croissance dans l'organisme de champignons filamenteux du genre « *Aspergillus* » (essentiellement *Aspergillus fumigatus*) et siégeant principalement dans l'appareil respiratoire.

Atopie : prédisposition héréditaire à développer une allergie, dont la traduction peut être une dermatite, un asthme ou des rhinites allergiques.

Bioaérosols : particules d'origine microbienne, animale, ou végétale en suspension dans l'air.

β -1,3-glucanes : sucres complexes (polysaccharides), constituants de la paroi cellulaire, notamment celle des champignons.

Chitine : polysaccharide de structure semblable à celle de la cellulose, constituant de la cuticule des insectes et des crustacés, et de la paroi de certains champignons.

Composé organique volatil (COV) : molécule organique, à l'état de vapeur à la température et à la pression ambiantes.

Hydrophile : qui a une affinité pour l'eau ; qui vit dans des milieux humides.

Immunogène : qualifie le pouvoir de toute substance d'origine étrangère, reconnue comme telle par le sujet exposé, capable de provoquer une réaction immunitaire.

Levure : organisme microscopique, unicellulaire, du règne des champignons, qui se multiplie par bourgeonnement et occasionnellement par sporulation.

Macromycètes : champignons supérieurs dont les organes reproducteurs sont bien visibles à l'œil nu.

Mannane : sucre complexe (oligosaccharide) présent dans la paroi cellulaire de certaines moisissures.

Métagénomique : science qui vise à étudier l'ensemble des génomes issus d'un même milieu ainsi que les interactions entre ces génomes.

Moisissure : champignon microscopique qui se développe sous la forme de filaments multicellulaires, appelés hyphes.

Mycotoxine : composé toxique issu du métabolisme d'un champignon.

Neutropénie : décompte de polynucléaires neutrophiles inférieur à 500/mm³.

Nosocomiale : qualifie une infection liée aux soins, acquise au cours d'une hospitalisation.

Pneumopathie : terme générique désignant les maladies du poumon.

Polynucléaire neutrophile : globule blanc caractérisé par un noyau présentant plusieurs lobes, 3 le plus souvent, et par de fines granulations du cytoplasme possédant une affinité marquée pour les colorants neutres.

Saprophyte : qui se nourrit de matières organiques en décomposition.

Spores : organes de dissémination assurant la reproduction des moisissures. Elles peuvent survivre très longtemps à l'état de repos, et lorsque les conditions environnementales sont favorables, elles germent et redonnent du mycélium végétatif.

Ubiquiste : se dit d'un organisme à grande plasticité écologique, qui se rencontre dans des milieux très différents.

Xérophile : qui vit dans des milieux pauvres en eau. Une moisissure est dite xérophile lorsqu'elle est capable de croître à une activité de l'eau inférieure à 0,85.

Liste des abréviations

AAE : Alvéolite allergique extrinsèque

ACGIH : Conférence américaine des hygiénistes industriels gouvernementaux (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*)

Aw : Activité de l'eau (*Activity of water*)

BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive

CHU : Centre hospitalier universitaire

COVm : Composés organiques volatils d'origine microbienne

CSHPF : Conseil supérieur d'hygiène publique de France

DALYs : Années de vie ajustées sur l'incapacité (*Disability Adjusted Life Years*), correspondant à la somme des années de vie potentielle perdues en raison d'une mortalité prématurée et des années de vie productives perdues en raison d'incapacités

EPA : Agence de protection de l'environnement des États-Unis (*United States Environmental Protection Agency, US EPA*)

ERMI : Indice de contamination fongique environnementale (*Environmental Relative Moldiness Index*)

HEPA : Filtre à air à très haute efficacité (*High Efficiency Particulate Air filter*)

HR : Humidité relative

HUD : Département du logement et du développement urbain des États-Unis (*United States Department of Housing and Urban Development*)

Ig (E, G) : Immunoglobuline de type E, ou G

INPES : Institut national de prévention et d'éducation pour la santé

INRS : Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des maladies professionnelles et des accidents du travail

INSPQ : Institut national de santé publique du Québec

InVS : Institut de veille sanitaire

IOM : Institut de médecine des États-Unis (*Institute Of Medicine*)

IRDES : Institut de recherche et documentation en économie de la santé

ISO : Organisation internationale de normalisation (International Organization for Standardization)

MALDI-TOF : Spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (Time-Of-Flight mass spectrometry).

OMS : Organisation mondiale de la santé

OQAI : Observatoire de la qualité de l'air intérieur

OR : Risque relatif rapproché (Odds Ratio)

ODTS : Syndrome toxique associé à l'exposition aux poussières organiques (Organic Dust Toxic Syndrome)

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)

qPCR : PCR quantitative

UFC : Unité formant colonie, unité de mesure utilisée en microbiologie pour exprimer la quantité de micro-organismes présents dans un échantillon

Liste des illustrations

Figure 1. Phylogénie et classification des champignons basées sur l'analyse de plusieurs gènes (Hibbett et al. 2007)	20
Figure 2. Cycle de vie des moisissures (D'après www.aspergillus.man.ac.uk)	22
Figure 3. Courbes limites de croissance fongique en fonction de l'humidité relative et de la température (D'après Clarke et al. 1999).....	25
Figure 4. Les substances et éléments fongiques susceptibles d'entraîner des effets sur la santé	27
Figure 5. Prévalence de l'humidité excessive dans les logements européens (OMS 2012) ..	37
Figure 6. Principe de l'échantillonnage des bioaérosols par la méthode d'impaction sur gélose (D'après Andersen 1958)	67
Figure 7. Protocole de quantification de la flore fongique viable par cytométrie en phase solide (D'après document ChemScan® RDI, AES Chemunex).....	90
Figure 8. Protocole d'évaluation d'un outil moléculaire pour l'étude de la contamination fongique de logements français.....	114
Figure 9. Comparaison de méthodes pour la mesure de la contamination fongique domiciliaire	128
Figure 10. Principales recommandations pour la conception et la construction de bâtiments afin de prévenir les problèmes d'humidité (D'après OMS 2009)	149
Tableau 1. Moisissures se développant sur des matériaux de construction et leur Aw (Li et Yang 2004).....	24
Tableau 2 : Pourcentages d'échantillons contaminés par divers groupes fongiques isolés à partir de sept types de matériaux de construction (Hyvärinen et al. 2002)	26
Tableau 3. Mycotoxines produites par des moisissures fréquemment isolées dans l'environnement intérieur (Nielsen 2003; Li & Yang 2004; Jarvis & Miller 2005).....	29
Tableau 4 : Synthèse de 3 méta-analyses étudiant les effets de l'humidité et des moisissures dans les logements sur la santé humaine (Mendell et al. 2011).....	39

Avant propos

La pollution de l'air intérieur est devenue au fil des ans un sujet de préoccupation tant pour les professionnels de la santé que pour la population en général. Dans des pays industrialisés tels que la France, la population passe près de 70 à 90 % de son temps à l'intérieur de locaux, où elle est exposée à une multitude de polluants de nature chimique, physique ou biologique. Or, depuis les années 70, la politique d'économie d'énergie, se traduisant par une meilleure isolation des locaux, a contribué au confinement des bâtiments. Ainsi, la problématique de la qualité de l'air intérieur est à présent reconnue comme une question de santé publique. La création de l'Observatoire de la qualité de l'air intérieur (OQAI) en juillet 2001 témoigne de sa prise en compte par les autorités publiques. A l'heure actuelle, quelques valeurs guides concernant les polluants de l'air intérieur ont été proposées, mais seulement pour des contaminants chimiques.



Les moisissures font partie des polluants biologiques des environnements intérieurs. Au cours des dernières décennies de nombreuses publications ont rendu compte du rôle délétère des moisissures sur la santé humaine. La contamination fongique des environnements intérieurs n'est pas un phénomène nouveau, puisqu'il est, en effet, déjà clairement évoqué dans l'Ancien Testament. Cependant il a été constaté un nombre croissant de plaintes liées à la présence de moisissures dans diverses constructions, qu'elles soient anciennes ou plus récentes.

La pollution de l'air intérieur par les moisissures est une réalité mal connue du public et du corps médical. Le développement de moisissures étant très fréquent dans les logements, un Livre Blanc a récemment été publié sur cette problématique de santé publique : «L'Air c'est la Vie...Un enjeu sanitaire majeur Pourquoi éviter la contamination fongique de l'habitat par les moisissures ? ». Ce livre, initié par la Fédération Française des Tuiles et Briques et le GIE Briques de France, présente des contributions croisées de plusieurs experts issus du monde médical et du bâtiment, ainsi que des élus et des représentants du milieu associatif. La problématique des moisissures est progressivement devenue importante, comme en témoigne la création, par Arrêté du 22 mai 2003, d'un groupe de travail « Moisissures dans l'habitat » au sein du Conseil supérieur d'hygiène publique de France. L'enquête menée par l'OQAI lors de la dernière campagne nationale Logements a confirmé l'ampleur de cette situation, puisque 37% des logements français présenteraient des moisissures visibles. Cependant des mesures environnementales n'ayant pu être effectuées, peu de données quantitatives d'exposition aux moisissures sont disponibles à ce jour.



Maisons moisies de Daniele Del Nero

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

Dans ce premier chapitre, la problématique de l'exposition aux moisissures en environnement intérieur sera présentée, en s'intéressant particulièrement aux effets des moisissures sur la santé humaine et aux principaux enjeux de santé publique qui en découlent. Puis, un état de l'art sur la mesure de l'exposition aux moisissures sera effectué afin de décrire les méthodes utilisées dans différents environnements intérieurs depuis plus d'une décennie.

I. Moisissures et leurs effets sur la santé humaine

Les moisissures sont des champignons microscopiques ubiquistes à croissance filamenteuse, qui regroupent des milliers d'espèces. Le terme familier de « moisissures » fait généralement référence à leur texture laineuse, poudreuse ou cotonneuse, qui peut être observée par exemple sur des aliments entreposés depuis un certain temps. L'objet de cette partie est de résumer les principales caractéristiques biologiques de ces micro-organismes afin de mieux comprendre les interactions entre les moisissures, l'Homme et l'environnement intérieur.

A. La classification et le cycle de vie des moisissures

Le règne fongique

Les champignons sont des organismes eucaryotes pluricellulaires ou unicellulaires. Leur matériel génétique est confiné dans un noyau au même titre que les plantes et les animaux. Ils possèdent toutefois un certain nombre de caractéristiques qui en font un groupe à part : parois contenant de la cellulose et de la chitine, absence de chlorophylle et de mobilité. L'ensemble de ces caractéristiques ont conduit les taxonomistes à classer les champignons dans un règne distinct, celui des mycètes (Kendrick 2001). Ce règne fongique regroupe entre autres les macromycètes (communément appelés champignons supérieurs), les levures, les mycobiontes, les mycoparasites, mais aussi les moisissures. Avec une diversité estimée à plus de 1,5 million d'espèces, c'est l'un des principaux composants des Eucaryotes.

La phylogénie des champignons

Historiquement, sur la base d'analyses morphologiques, l'ensemble des champignons était réparti en cinq ordres. Selon le mode de reproduction sexuée, quatre de ces ordres ont été définis : les Chytridiomycètes, les Zygomycètes, les Basidiomycètes et les Ascomycètes.

Cependant, certaines moisissures, souvent ou exclusivement rencontrées à des stades de multiplication asexuée, ont été regroupées dans l'ordre des Deutéromycètes ou *Fungi imperfecti*. Les moisissures qui prolifèrent sur les matériaux de construction et les surfaces à l'intérieur des résidences et des édifices se retrouvent fréquemment dans des circonstances de croissance favorisant uniquement le stade asexué. Ainsi, bien que cette taxonomie soit artificielle, les critères de classification des Deutéromycètes (basée sur le mode de production des spores asexuées ou conidies) sont toujours utilisés dans la pratique comme éléments d'identification des contaminants de l'environnement intérieur.

Récemment, des études phylogéniques, basées sur l'analyse de plusieurs gènes (T. Y. James et al. 2006; Hibbett et al. 2007), ont créé une nouvelle classification du règne des Eumycota (Figure 1). Le terme Dikarya désigne le sous-embranchement qui regroupe les deux phylums les plus importants : Ascomycota et Basidiomycota. Ce sont des champignons dont une étape de leur cycle de vie est caractérisée par la présence de deux noyaux au sein d'une cellule. La plupart des moisissures appartenant anciennement aux Deutéromycètes ont été classées à l'aide d'outils moléculaires dans les Ascomycota. Ce phylum regroupe plus de 65 000 espèces, soit 65 % de la diversité fongique décrite.

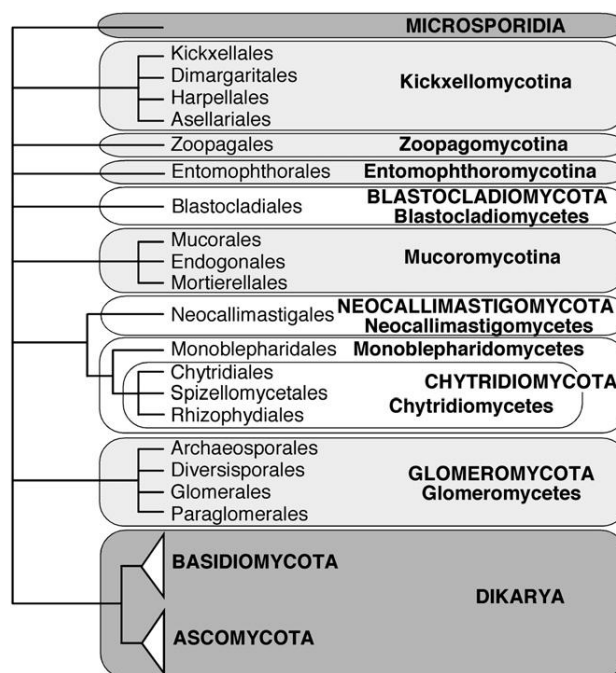


Figure 1. Phylogénie et classification des champignons basées sur l'analyse de plusieurs gènes (Hibbett et al. 2007)

Principales caractéristiques biologiques des moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques filamenteux dont le réservoir naturel se situe à l'extérieur, sur les végétaux, la matière organique en décomposition, à la surface

d'eau stagnante ainsi que dans le sol ou à la surface de ce dernier. Dépourvus de chlorophylle, ils ne peuvent pas, comme les plantes, synthétiser leur matière organique à partir du CO₂ atmosphérique. Ils doivent donc puiser dans le milieu ambiant l'eau et les substances organiques et minérales nécessaires à leurs propres synthèses ; ils sont hétérotrophes (Kendrick 2001). Pour cela, ils dégradent la matière organique complexe grâce à l'excrétion d'enzymes et d'acides puis ils en absorbent les composants digérés, tout ceci s'effectuant à travers la paroi perméable de leur appareil végétatif. Ils peuvent être saprophytes s'ils se développent sur de la matière organique inerte ou parasites s'ils se développent sur du vivant. Certains sont symbiotiques car ils vivent en association à bénéfice réciproque avec d'autres organismes. Lorsque les conditions le permettent, les moisissures produisent, à maturité, des spores qui peuvent être transportées par les courants d'air ou par les humains et les animaux, et se retrouver éventuellement dans les maisons et édifices.

Ces spores sont des structures de reproduction invisibles à l'œil nu qui assurent la dissémination des moisissures, étape clé de leur cycle de vie (Figure 2). Le diamètre de ces organes de résistance varie de 2 à 250 µm, avec une majorité entre 2 et 20 µm. La dispersion de ces structures microscopiques peut ainsi se faire sur de grandes distances. Tout comme en milieu extérieur, le cycle de vie des moisissures en milieu intérieur débute lorsqu'une spore se dépose sur une surface lui offrant les conditions nécessaires à sa croissance. En fait, la germination se déclenchera par la présence d'eau combinée ou non à certains facteurs très spécifiques comme l'intensité lumineuse, certaines températures ou types d'éléments nutritifs. La spore germera alors et donnera naissance à un premier filament non différencié, appelé hyphe, qui s'allongera pour former un ensemble appelé mycélium. Cet ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, constitue le thalle des champignons. En présence de conditions favorables à la sporulation, le mycélium donnera naissance à des structures plus spécialisées, qui produiront des spores asexuées (conidies) ou, plus rarement, des spores sexuées.

Chaque moisissure produit un très grand nombre de spores dont l'ensemble, appelé sporée, se présente très souvent sous un aspect poudreux et coloré à la surface de la moisissure. La taille, la forme et la couleur des spores de moisissures varient grandement d'une espèce à l'autre. Par contre, en microscopie, toutes les spores d'une même espèce sont de couleur, de dimension et de forme relativement constantes ce qui, dans bien des cas, constitue un élément d'identification taxonomique (ACGIH 1999).

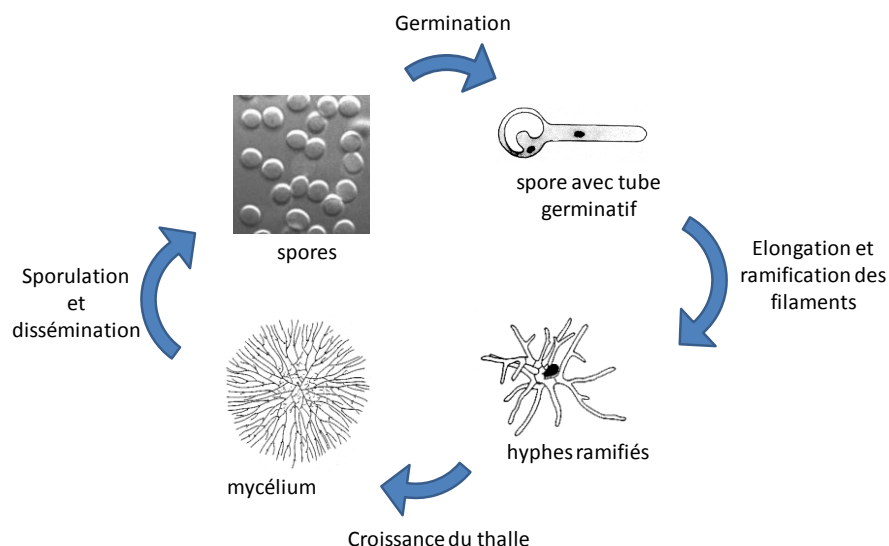


Figure 2. Cycle de vie des moisissures (D'après www.aspergillus.man.ac.uk)

B. L'écologie des moisissures en environnement intérieur

Les moisissures, dont les spores sont généralement aérosolisées par le vent, sont naturellement présentes dans l'air extérieur. Cependant, elles pénètrent aussi facilement dans les locaux, par l'intermédiaire des occupants ou via les systèmes de ventilation. Les spores de moisissures peuvent exploiter des niches écologiques diverses dans les environnements intérieurs.

L'influence des facteurs environnementaux

De nombreux paramètres environnementaux influencent la croissance fongique. Les facteurs biotiques incluent notamment la viabilité des spores, la nature des espèces fongiques, les phénomènes de compétition entre champignons et avec les autres organismes. Des paramètres physiques et chimiques, dits abiotiques, influencent aussi le développement des moisissures : le pH, l'oxygène, la lumière, la température, les nutriments, et l'humidité.

Température

Les champignons ayant une large gamme de température de croissance présentent un avantage compétitif par rapport aux autres organismes. C'est le cas notamment d'*Aspergillus fumigatus*, capable de se développer à des températures comprises entre 12 et 52°C. Cependant, les moisissures présentes en environnement intérieur sont majoritairement mésophiles : leur croissance est optimale à des températures proches de la température ambiante des locaux.

Éléments nutritifs

La majorité des moisissures sont peu exigeantes en éléments nutritifs nécessaires à leur croissance. En effet, leur contenu enzymatique leur permet de se servir des matières organiques retrouvées en particulier dans les aliments, mais aussi dans les matériaux de construction. Certains champignons, tels que les espèces du genre *Aspergillus* et *Penicillium*, préfèrent des sucres simples et se développent très rapidement (ils sont appelés « *sugar fungi* »). D'autres sont capables de dégrader des polymères (tels que la cellulose et la lignine) ou des matières organiques complexes comme le bois ; ce sont généralement des colonisateurs tardifs. La colonisation des matériaux par les moisissures induit leur biodégradation et résulte de deux types de mécanismes : une action physique liée au développement des hyphes dans le matériau ; et une action chimique imputable à la production de divers métabolites qui agissent par assimilation ou déssimilation (CSHPF 2006). Le papier et la colle présents en surface du placoplâtre, les tuiles cartonnées des plafonds suspendus, les recouvrements de papier peint encollé ainsi que les matériaux de recouvrement composés d'agglomérés de particules de bois constituent des substrats facilement dégradables par les moisissures, en plus d'être des matériaux qui retiennent facilement l'eau (Gravesen et al. 1999). Les produits cellulosiques, qui sont de plus en plus présents dans les constructions récentes, constituent donc d'excellents supports de la croissance des moisissures, de même que tout amas de matières végétales ou de poussières organiques.

Humidité

Dans les environnements intérieurs, les éléments nutritifs sont généralement abondants et la température est habituellement modérée. L'humidité est donc souvent le facteur limitant pour la germination des spores et le développement des moisissures. Comme tout organisme vivant, les champignons ont besoin d'eau disponible pour de nombreuses activités physiologiques et métaboliques.

Il existe différents termes pour décrire la présence d'eau dans les matériaux. L'activité de l'eau est souvent utilisée : notée A_w , elle se définit comme le rapport entre la pression partielle de l'eau dans un matériau sur la pression de vapeur saturée de l'eau pure à la même température. Théoriquement, les limites pour la croissance microbienne s'étendent de 0,65 à 1, avec une limite inférieure absolue de 0,55. Les moisissures communément rencontrées dans les bâtiments peuvent croître, selon les espèces, à des taux d'activité de l'eau (A_w) dans les matériaux allant de 0,70 A_w à 0,95 A_w , tel que présenté au Tableau 1. Cependant, il n'existe pas de techniques utilisables sur le terrain permettant de fournir des mesures directes d'activité de l'eau.

Tableau 1. Moisissures se développant sur des matériaux de construction et leur Aw (Li et Yang 2004)

Colonizer group	a_w range	Classification	Fungal example
Primary colonizers (storage fungi)	<0.80	Xerophilic/ Xerotolerant	<i>Penicillium chrysogenum</i> , and <i>Aspergillus versicolor</i> : the most common ones; <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>A. ustus</i> , <i>Eurotium</i> spp., <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>P. palitans</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , and <i>Wallemia sebi</i>
Secondary colonizers	0.80–0.9	Mesophilic	<i>Alternaria</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Phoma</i> spp., and <i>Ulocladium</i> spp.
Tertiary colonizers (water-damage fungi)	>0.9	Hydrophilic	<i>Chaetomium globosum</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Memnoniella echinata</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i> , <i>Trichoderma</i> spp. (<i>T. atroviride</i> , <i>T. citrinoviride</i> , <i>T. harzianum</i> , and <i>T. longibrachiatum</i>)

Outre la disponibilité de l'eau sous forme liquide, l'eau contenue dans la phase gazeuse (vapeur d'eau) a aussi de l'importance pour la croissance fongique (ACGIH 1999). L'humidité relative (HR) correspond au rapport entre la quantité d'eau présente dans l'air et la quantité maximale d'eau que l'air pourrait contenir à la même température. Une humidité relative élevée et persistante dans un habitat peu ventilé permet une augmentation de l'Aw des matériaux de construction, et ainsi le développement d'espèces xérophiles.

L'humidité intérieure et la diversité fongique

Les causes d'humidité intérieure sont nombreuses. Les défauts de bâti peuvent être à l'origine d'infiltrations (toiture, murs) ou de remontées d'humidité à partir du sol. Les défauts d'isolation peuvent entraîner des ponts thermiques et de la condensation sur les vitrages. A cela s'ajoutent les dégâts des eaux causés par des fuites d'eau et inondations. L'humidité provient également de l'occupation humaine : la respiration et les activités domestiques (cuisson, toilette, vaisselle, lessive, séchage du linge...) produisent en effet de la vapeur d'eau dans les environnements intérieurs. Si cette vapeur d'eau ne peut être évacuée du fait d'une ventilation insuffisante, elle se condense sur les matériaux.

En étudiant l'influence des facteurs environnementaux, certains chercheurs développent des modèles pour prédire le développement des moisissures dans les bâtiments. A la suite d'une revue de la littérature et de validations en laboratoire sur des espèces spécifiques, Clarke et ses collègues ont défini six groupes de champignons allant des moisissures fortement hydrophiles aux moisissures fortement xérophiles (Clarke et al. 1999). Les courbes de

croissance représentées sur la Figure 2 correspondent aux combinaisons minimales de l'humidité relative et de la température permettant le développement fongique en surface d'un bâtiment.

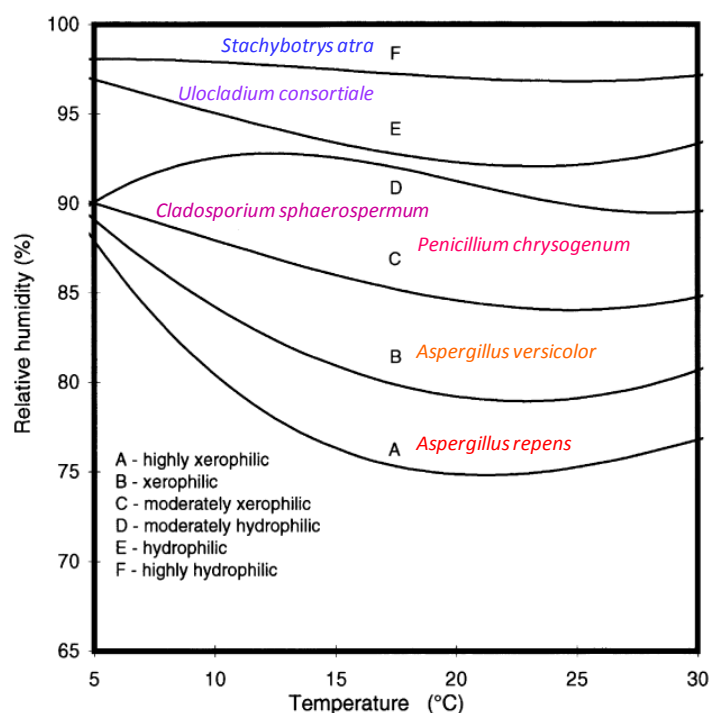


Figure 3. Courbes limites de croissance fongique en fonction de l'humidité relative et de la température (D'après Clarke et al. 1999).

Une trentaine de genres fongiques sont observés de façon régulière en milieu intérieur contaminé par les moisissures. Les plus fréquemment cités sont les genres *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, et *Alternaria*. Cependant de nombreux autres champignons ont été isolés de matériaux de construction, appartenant à divers genres fongiques tels que *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Epicoccum*, *Exophiala*, *Phialophora*, *Phoma*, *Serpula*, *Stachybotrys*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma* et *Wallemia* (INSPQ 2002b; CSHPF 2006). Le Tableau 2 rapporte la fréquence d'isolement par culture de 24 taxons fongiques dans 1140 échantillons provenant de divers matériaux contaminés : bois, papier, placoplâtre, isolation minérale, peinture, colle, plastiques, produits céramiques (Hyvärinen et al. 2002). L'écologie fongique dans les environnements intérieurs reste toutefois un champ à explorer pour mieux comprendre la complexité des interactions. La succession des colonisations fongiques dans les matériaux de construction et les mécanismes de dispersion des spores dans ces environnements sont encore peu connus (Yang & Heinsohn 2007).

Tableau 2 : Pourcentages d'échantillons contaminés par divers groupes fongiques isolés à partir de sept types de matériaux de construction (Hyvärinen et al. 2002)

	Percentage of samples contaminated						
	Wood (n = 438)	Paper (n = 49)	Gypsum boards (n = 43)	Ceramic products (n = 161)	Mineral insulation (N = 217)	Paints and glues (n = 86)	Plastics (n = 125)
<i>Acremonium</i>	20.0	16.3	14.0	34.8	24.4	29.1	18.4
<i>Aspergillus</i> spp.	16.9	18.4	16.3	22.4	23.5	23.3	28.8
<i>A. versicolor</i>	9.4	14.3	14.0	27.3	10.1	25.6	15.2
<i>Aureobasidium</i>	25.1	14.3	11.6	5.0	15.7	7.0	12.8
<i>Chaetomium</i>	3.7	8.2	0	2.5	4.2	2.3	1.6
<i>Cladosporium</i>	6.2	22.5	4.7	14.9	18.4	11.6	7.2
<i>Eurotium</i>	0.9	4.1	0	1.9	0.9	0	0
<i>Exophiala</i>	5.7	2.0	2.3	1.2	1.8	1.2	2.4
<i>Fusarium</i>	5.5	2.0	0	5.0	0.5	2.3	6.4
<i>Geomyces</i>	2.7	0	0	1.2	0.5	0	2.4
<i>Mucor</i>	3.7	2.0	2.3	2.5	4.2	0	4
Non-sporing isol.	39.7	30.6	34.9	37.9	42.9	36.1	31.2
<i>Oidiodendron</i>	7.3	2.0	0	0	6.0	1.2	0.8
<i>Paecilomyces</i>	8.7	4.1	7.0	4.4	3.7	4.7	3.2
<i>Penicillium</i>	61.2	63.7	51.2	37.3	56.7	33.7	38.4
<i>Phialophora</i>	10.3	10.2	7.0	5.0	3.7	1.2	12.0
<i>Rhizopus</i>	2.1	4.1	0	1.9	1.4	0	1.6
<i>Scopulariopsis</i>	3.9	2.0	2.3	7.5	1.8	2.3	4.8
Sphaeropsidales	17.1	10.2	11.6	11.2	14.3	10.5	16
<i>Stachybotrys</i>	3.0	10.2	30.2	5.0	3.7	4.7	2.4
<i>Trichoderma</i>	8.0	2.0	7.0	3.7	8.8	3.5	2.4
<i>Tritirachium</i>	2.0	2.0	0	9.9	1.4	14.0	4.8
<i>Ulocladium</i>	3.2	4.1	4.7	0.6	2.8	2.3	3.2
<i>Wallemia</i>	0	0	0	0.6	0	0	0
Yeasts	42.7	34.7	20.9	13.7	34.1	23.3	32.8

C. Les composantes fongiques potentiellement responsables d'effets cliniques

L'exposition aux moisissures dans les environnements intérieurs peut se faire par inhalation ou, dans une moindre mesure, par contact cutané et par ingestion (Mazur & Kim 2006). Les spores sont particulièrement bien adaptées pour une dispersion dans l'air grâce à leur couche superficielle de protéines hydrophobes, appelées hydrophobines (Bayry et al. 2012). Pénétrant facilement dans le système respiratoire, certaines spores parviennent à atteindre les alvéoles pulmonaires (Eduard 2009). De plus, les champignons peuvent libérer de grandes quantités de fragments fongiques capables de se déposer dans les voies aériennes (Górny 2004). Provenant d'hyphes et de spores fracturées, ces fragments sont généralement classés en deux catégories : les particules inférieures à 1 µm et les fragments fongiques plus larges (> 1 µm). Enfin, diverses composantes fongiques sont susceptibles d'entraîner des effets sur la santé d'un individu exposé. Il s'agit de substances élaborées par les moisissures ou d'éléments constituant les parois des spores et du mycélium (Figure 4).

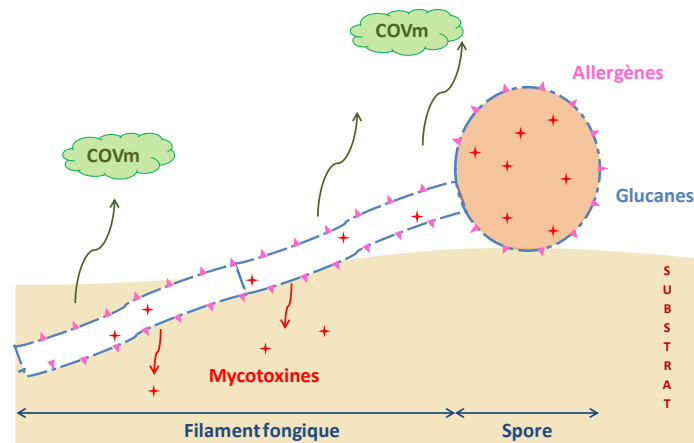


Figure 4. Les substances et éléments fongiques susceptibles d'entraîner des effets sur la santé

Les glucanes

Les glucanes, ou β -1,3-glucanes, sont des polymères de glucose présents dans la paroi cellulaire de la majorité des moisissures, pouvant être associés à des molécules de chitine ou de mannane. Ce sont des composés non allergènes retrouvés aussi chez certaines bactéries et plantes (Rylander & Lin 2000; Bex & Squinazi 2006). Ces sucres complexes peuvent, dans certains cas, avoir des effets immunogènes et stimuler la fonction des macrophages et des polynucléaires neutrophiles. Ils pourraient être impliqués dans des processus inflammatoires en déclenchant la production d'immunoglobulines de type G (IgG) spécifiques (Douwes 2005). Les glucanes feraient aussi partie du mélange complexe lié à l'apparition du syndrome toxique associé à l'exposition aux poussières organiques (ODTS, *organic dust toxic syndrome*) (ACGIH 1999).

Les allergènes

De nombreux champignons peuvent théoriquement provoquer des réactions allergiques chez les humains, réactions caractérisées par la production d'immunoglobulines E (IgE) (Kurup 2003). Cependant les moisissures les plus fréquentes, et connues pour être impliquées dans les allergies, appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, et *Penicillium*. Environ 70 allergènes fongiques ont été décrits par le Comité international de nomenclature des allergènes (Kurup et al. 2002). Diverses substances ont été identifiées dont des protéines, des polysaccharides et des lipopolysaccharides (Husman 1996). Outre les spores, les fragments fongiques sont aussi une source importante d'aéroallergènes (Green et al. 2006). Des travaux sur 11 espèces fongiques ont montré que les spores de moisissures libèrent après germination de plus grandes quantités d'allergènes qu'avant germination (Green et al. 2003). Cependant la couche superficielle des conidies en dormance, constituée d'hydrophobines, peut masquer la reconnaissance des allergènes par le système immunitaire, et donc empêcher une réponse immunitaire (Aimanianda et al.

2009). Enfin, il a été montré que les réactions croisées entre allergènes sont une composante importante de la sensibilisation fongique (Crameri et al. 2009).

Les composés organiques volatils d'origine microbienne (COVm)

Le métabolisme des moisissures produit des composés organiques volatils d'origine microbienne (COVm), qui sont responsables de l'odeur caractéristique associée aux moisissures. Ainsi, le seuil de détection olfactive très faible de certains de ces COVm permet de déceler des odeurs de « moisi » bien avant l'apparition des signes visibles du développement mycélien sur les matériaux de construction (Schleibinger et al. 2008). Plus de 200 composés ont été identifiés, incluant des alcools, aldéhydes, esters, terpènes... Comme ils sont présents sous forme gazeuse, les COVm peuvent traverser librement les matériaux poreux des bâtiments ; ainsi, même lorsqu'elles prolifèrent dans des espaces en apparence fermés (derrière des cloisons par exemple), les moisissures peuvent entraîner une exposition aux COVm (Pasanen et al. 1998). Certains composés sont produits par plusieurs espèces fongiques, d'autres seraient spécifiques au niveau du genre ou de l'espèce. Un indice fongique a ainsi été développé à partir de COVm spécifiques pour détecter la croissance de moisissures (visibles ou cachées) (Moularat et al. 2008). Les symptômes d'irritation des yeux, du nez et de la gorge ont souvent été rapportés en présence de fortes odeurs produites par une croissance abondante de moisissures. L'effet synergique et irritatif d'un mélange de composés a en effet été démontré chez des souris (Korpi et al. 1999). Cependant, il y a peu de chance que les faibles concentrations de COVm retrouvées dans les environnements intérieurs soient à l'origine d'effets toxiques chez l'Homme (Kreja & Seidel 2002). La complexité du milieu intérieur rend difficile d'isoler le rôle propre des COVm fongiques dans le développement des maladies, car de nombreux matériaux de construction émettent aussi des COV (Reboux et al. 2011).

Les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de masse moléculaire relativement faible, élaborés par diverses moisissures sous certaines conditions environnementales. Leur biosynthèse est dépendante de plusieurs facteurs, dont la température, l'intensité lumineuse, le dioxyde de carbone dans l'air, les éléments nutritifs disponibles et la présence d'autres espèces en compétition (Hendry & Cole 1993). Chaque mycotoxine n'est pas nécessairement spécifique d'une moisissure donnée, comme en témoigne le Tableau 3.

Tableau 3. Mycotoxines produites par des moisissures fréquemment isolées dans l'environnement intérieur (Nielsen 2003; Li & Yang 2004; Jarvis & Miller 2005)

Moisissures	Mycotoxines
<i>Alternaria alternata</i>	Acide tenuazonique, alternatiol, altertoxines
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxine B1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Gliotoxine, verruculogène, fumitoxines,
<i>Aspergillus niger</i>	Ochratoxine A, naphthopyrone, malformines, nigragilline
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ochratoxine A, acide pénicillique, xanthomégline
<i>Aspergillus sydowii</i>	Acide sydowique, aspermutarubrol
<i>Aspergillus unguis</i>	Stérigmatocystines
<i>Aspergillus ustus</i>	Austamide, austdiol, austocystines
<i>Aspergillus versicolor</i>	Stérigmatocystines, versicolorines
<i>Chaetomium globosum</i>	Chaetoglobosines, chaetomine
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Cladosporines
<i>Eurotium herbariorum</i>	Echinulines, néoéchinulines, flavoglaucines, auroglaucines
<i>Paecilomyces variotii</i>	Viriditoxine
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Auranthine, acide pénicillique, verrucosidine, nephrotoxines
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Acide mycophénolique, brevianamides A et B
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Roquefortine C, méléagine, chrysogine
<i>Penicillium corylophilum</i>	Citreoisocoumarinol
<i>Penicillium glabrum</i>	Trypacidine, citromycétine
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Trichothécènes macrocycliques, atranones, lactames
<i>Trichoderma harzianum</i>	Alaméthიცines, émoline, suzukacilline, trichodermine
<i>Wallemia sebi</i>	Wallemins A et B, wallemine

Plusieurs de ces toxines sont relativement stables et leur toxicité peut persister longtemps et ce, même lorsque les éléments fongiques ne sont plus viables. Les mycotoxines se trouvent dans le mycélium et les spores, et peuvent aussi diffuser dans le substrat (Bloom et al. 2009). La taille des particules les contenant (spores ou fragments mycéliens par exemples) ou sur lesquelles elles sont adsorbées (comme les poussières), déterminera la profondeur de la pénétration des substances toxiques dans l'arbre bronchique. Expérimentalement, des effets délétères ont été prouvés chez l'animal : des effets immunosuppresseurs, mutagènes, tératogènes, cancérigènes, neurotoxiques et hépatotoxiques (Li & Yang 2004). Il n'est cependant pas prouvé à l'heure actuelle que les niveaux de mycotoxines dans l'air des bâtiments humides soient suffisamment élevés pour causer des effets négatifs sur la santé (OMS 2009).

La croissance fongique est donc source de quantités importantes de spores, fragments cellulaires, allergènes, mycotoxines, glucanes et composés organiques volatils dans l'air intérieur. Les agents responsables des effets négatifs sur la santé n'ont pas été identifiés de façon probante, mais un niveau élevé de l'un de ces agents dans l'environnement intérieur est un risque potentiel pour la santé (OMS 2009).

D. Les effets sur la santé associés aux moisissures

Les effets des moisissures sur la santé des occupants sont fonction du mode et de l'importance de l'exposition, de la nature de l'agent en cause et de la susceptibilité des individus exposés (état de santé, âge, etc.). Des effets irritatifs, immunologiques, infectieux et toxiques ont été reportés (Fischer & Dott 2003). Les symptômes rencontrés touchent donc plusieurs systèmes du corps humain, mais plus particulièrement le système respiratoire.

Les effets irritatifs

Les symptômes d'irritation des yeux, du nez et de la gorge ont souvent été associés à la présence de fortes concentrations fongiques. Par contre, le mécanisme causal à l'origine des symptômes ressentis ou rapportés n'a pas encore été établi avec certitude. L'hypothèse généralement retenue est celle de l'existence d'un phénomène d'irritation mécanique due aux spores et fragments fongiques de l'air venant en contact direct avec les muqueuses, combiné à une irritation chimique due aux produits irritants ou toxiques provenant des particules fongiques, tels que les mCOV et les glucanes (INSPQ 2002a).

Les réactions immunologiques

La réponse allergique (ou d'hypersensibilité de type I) survient lorsqu'il y a production d'IgE dirigées contre des allergènes environnementaux ou autres. Les réactions allergiques provoquées par l'inhalation de spores fongiques constituent un problème de santé reconnu par les cliniciens depuis des décennies. L'exposition aux moisissures est associée à l'apparition de pathologies allergiques diverses : rhinite, dermatite, bronchite allergique, aspergillose broncho-pulmonaire allergique, asthme allergique. En pratique, le seuil de réactivité varie d'un individu à l'autre et selon le type de moisissure pour un même individu. La sévérité de la réaction dépend aussi d'un grand nombre de facteurs et n'est donc pas seulement proportionnelle à la dose d'exposition. Il a été montré que jusqu'à 10 % de la population réagirait positivement aux tests d'extraits de moisissures (Verhoeff & Burge 1997), tandis que cette proportion pourrait atteindre 20,9 % à 27,4 % chez les personnes souffrant d'asthme (Boulet et al. 1997). L'allergie aux moisissures est cependant difficile à diagnostiquer, notamment à cause de l'absence d'extraits d'allergènes standardisés (InVS 2005). De plus, les extraits commercialisés sont généralement peu représentatifs des moisissures retrouvées en environnement intérieur. Une exposition chronique en milieu

industriel ou agricole à des poussières organiques et surtout à des moisissures peut aussi induire la production d'anticorps spécifiques (IgG) et causer un syndrome appelé pneumopathie d'hypersensibilité ou alvéolite allergique extrinsèque. La pneumopathie dite du « poumon du fermier », par exemple, est une maladie professionnelle connue dans le monde agricole (Reboux et al. 2001).

Les effets infectieux

Diverses moisissures environnementales peuvent être à l'origine d'infections. Les champignons du genre *Aspergillus* sont par exemple responsables d'aspergilloses chez la plupart des oiseaux et des mammifères (Guillot & Chermette 2001). Chez l'Homme, l'aspergillose invasive est une infection bien connue en milieu hospitalier, parfois d'origine nosocomiale, incitant à la mise en place de stratégies de prévention (Gangneux et al. 2002). Une fois inhalées, les conidies d'*Aspergillus* peuvent entraîner chez des patients sévèrement immunodéprimés (essentiellement neutropéniques ou patients traités par corticothérapie au long cours) une invasion du tissu pulmonaire, et parfois une dissémination à d'autres organes. L'aspergillose invasive peut avoir des conséquences particulièrement graves voire même fatales pour ces individus, et représente donc la forme infectieuse la plus grave. Des formes localisées existent également. En effet, certaines espèces de moisissures sont capables de se multiplier au fond des alvéoles et de former un amas de mycélium, appelé mycétome. Ces mycétomes, dont le plus connu est l'aspergillome (Kawamura et al. 2000), ne constituent pas une infection à proprement parler mais plutôt une colonisation dont les effets sur la santé se caractérisent par une obstruction pulmonaire, source constante d'irritants ou d'allergènes, mais aussi de complications pouvant parfois mettre en jeu le pronostic vital. A l'interface entre les formes localisées et les formes invasives, sont décrites des atteintes semi-invasives, cavitaires ou nécrosantes, qui évoluent de façon chronique. La colonisation de l'arbre respiratoire par un certain nombre de champignons est aussi fréquente chez les personnes atteintes de mucoviscidose (Horré et al. 2010). Enfin, il est à noter que des effets immunosuppresseurs occasionnés par une exposition à certaines moisissures peuvent rendre certains sujets susceptibles à de multiples infections (Husman 1996).

Les effets toxiques

La majorité des effets toxiques causés par inhalation de moisissures ont été associés à des expositions en milieu industriel ou agricole, c'est-à-dire dans des endroits où leur concentration s'avère élevée et où l'exposition est répétitive ou chronique. Outre la pneumopathie d'hypersensibilité discutée précédemment, une forte exposition aux poussières organiques contaminées par des moisissures pourrait causer le syndrome

toxique ODTS (Bünger et al. 2007; Reboux 2006). Cette affection peut se caractériser par un brusque excès de fièvre, par des symptômes s'apparentant à ceux d'une grippe et par des problèmes respiratoires survenant dans les heures suivant une unique mais forte exposition. Les autres effets toxiques provoqués par les moisissures surviennent dans des cas d'expositions répétées à une contamination environnementale, donnant lieu à une dose cumulative élevée, et se manifestant à moyen ou à long terme. Le terme «mycotoxicose», surtout employé dans les cas d'intoxications suivant l'ingestion d'aliments contaminés par des moisissures et contenant des mycotoxines, désigne aussi, par extension, les effets systémiques dus à l'exposition environnementale à des doses importantes de toxines fongiques (Sherif et al. 2009; Lanier et al. 2012). Depuis 1986, *Stachybotrys chartarum*, reconnu pour causer diverses mycotoxicoses, a été associé à plusieurs reprises à des cas d'hémorragie pulmonaire chez les jeunes enfants (Nielsen 2003; Vesper & Vesper 2002; Millon et al. 2006). Enfin, l'exposition à des concentrations fongiques fortes peut entraîner des dysfonctionnements multiples d'organes (Curtis et al. 2004).

Certains individus ou groupes d'individus sont plus susceptibles de développer des problèmes de santé lorsqu'ils sont exposés à des contaminants fongiques. Les populations les plus souvent mentionnées sont les individus atopiques (qui ont une prédisposition aux manifestations allergiques), les personnes atteintes par certaines maladies (telles que la mucoviscidose), les individus souffrant de problèmes respiratoires (telles que l'asthme et les maladies pulmonaires obstructives chroniques), les nourrissons et les jeunes enfants, les personnes âgées, et les individus immunodéprimés. Comme elles passent généralement plus de temps à l'intérieur, les personnes vulnérables sont en même temps les plus exposées (INSPQ 2002a).

Par ailleurs, le milieu intérieur est susceptible de contenir une multitude de contaminants (Le Cann et al. 2011) : acariens, poils d'animaux domestiques, substances chimiques... Dans certains cas, les symptômes que provoquent ces contaminants peuvent s'apparenter à ceux attribuables aux moisissures. C'est pourquoi, il importe de considérer l'implication possible de ces contaminants, même dans les cas où des symptômes compatibles avec les moisissures sont observés.

II. Problèmes de santé publique liés aux moisissures

Les effets de l'exposition aux moisissures varient fortement selon le contexte environnemental et les populations exposées. Dans certains environnements tels que les hôpitaux, diverses mesures de protection sont mises en place pour maîtriser le risque fongique environnemental vis-à-vis des personnes très vulnérables. Dans un contexte bien différent, des groupes de travailleurs peuvent être exposés à de fortes concentrations en moisissures lors de l'exécution de tâches spécifiques liées à des procédés agricoles, industriels ou agroalimentaires. Bien que les effets allergisants, toxiques et infectieux des moisissures sur la santé humaine soient documentés, le niveau de preuve varie largement selon les pathologies et le type d'étude (Reboux et al. 2010). Dans des cas spécifiques tels que les infections fongiques et les pneumopathies d'hypersensibilité, le rôle des moisissures est indéniable, mais touche une population restreinte. À l'inverse, pour un nombre important de pathologies, comme le syndrome des bâtiments malsains et certaines maladies respiratoires touchant plus largement la population, le rôle des moisissures n'est pas établi avec certitude (Tischer & Heinrich 2012). Dans cette partie, différents problèmes de santé publique liés aux moisissures seront présentés ; un intérêt particulier sera porté sur les contaminations fongiques dans l'environnement domiciliaire.

A. Le risque fongique : de l'infection nosocomiale aux maladies professionnelles

Selon la vulnérabilité des individus, certains micro-organismes pathogènes peuvent être dangereux à des niveaux de concentrations extrêmement faibles, alors que d'autres peuvent représenter des risques pour la santé lorsqu'ils sont présents à des niveaux beaucoup plus élevés. Ce phénomène sera illustré dans deux types d'environnements intérieurs où le risque fongique représente une préoccupation de santé publique : l'hôpital et l'environnement au travail.

Les infections fongiques, une préoccupation de santé publique à l'hôpital

Les infections fongiques dues aux champignons filamenteux sont des maladies redoutables à l'hôpital en dépit de l'évolution récente des stratégies thérapeutiques. Le risque d'acquisition de ces infections et leur pronostic varient selon le niveau d'exposition d'un individu aux sources de spores fongiques et de ses capacités à mettre en place une réponse anti-infectieuse efficace. Les infections à *Aspergillus* figurent au premier rang en terme de gravité, puisque le taux de mortalité lié aux aspergilloses est proche de 50% en France (Lortholary et al. 2011). *Aspergillus fumigatus* est responsable de la grande majorité des

infections fongiques invasives (Garcia-Vidal et al. 2008; Thornton 2010). Cependant diverses moisissures présentes dans l'environnement peuvent induire des infections telles que des zygomycoses, des scédosporioses, des fusarioses, etc (Fleming et al. 2002). De plus, de nombreux champignons présentent des résistances aux antifongiques conventionnels (amphotéricine B et/ou voriconazole).

Les patients hébergés en établissement de santé peuvent acquérir une infection fongique invasive associée aux soins, notamment les patients fortement immunodéprimés tels que ceux traités par une chimiothérapie neutropénisante (entraînant une diminution du nombre de polynucléaires neutrophiles) ou ceux bénéficiant d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Gangneux et al. 2010). Les vecteurs de ces spores fongiques sont multiples : l'air, les surfaces, l'eau ou encore l'alimentation (Warris & Verweij 2005). L'ensemble des activités autour du patient, d'ordre médical, paramédical, ou encore les visites de la famille, sont des situations pouvant générer un risque d'infection. Ainsi, des mesures d'hygiène et le traitement de l'air sont mis en place dans les services à risque, permettant de limiter l'exposition de ces patients aux spores fongiques. L'objectif visé est de diminuer la morbidité et la mortalité de ces maladies, et par voie de conséquence de réduire la consommation de soins associée (allongement de la durée d'hospitalisation, prescription d'examens complémentaires et consommation d'antifongiques).

Une fois les stratégies de prévention mises en place, des protocoles de surveillance fongique permettent d'évaluer leur efficacité (Nicolle et al. 2002; Gangneux et al. 2006). Les seuils cibles et d'alerte de la biocontamination de l'air et des surfaces sont généralement à définir au cas par cas en fonction de l'écologie locale et de la conception des bâtiments hospitaliers. Cependant, l'absence de champignon filamenteux reste la valeur cible consensuelle pour les prélèvements effectués sous un flux laminaire. Enfin, les mesures de protection sont renforcées lors de périodes de travaux, car ceux-ci génèrent la mise en suspension de spores fongiques et augmentent considérablement le risque d'exposition des patients fragiles (Haiduvén 2009; Gangneux et al. 2012).

L'exposition fongique au travail, source de maladies professionnelles

Certains groupes de travailleurs œuvrant dans des conditions environnementales bien particulières peuvent être exposés à de fortes concentrations en moisissures. Que ce soit par le biais de réactions immunoallergiques ou par l'intermédiaire de toxines, les champignons sont de plus en plus mis en cause dans de nombreuses affections pulmonaires : broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), pneumopathie d'hypersensibilité, asthme, syndrome ODS (Radon et al. 2002; Reboux et al. 2006).

La BPCO se définit comme une maladie chronique inflammatoire, lentement progressive atteignant les bronches. Cette affection est caractérisée par une diminution non complètement réversible des débits aériens. Les atteintes respiratoires en milieu agricole seraient dominées, en termes de fréquence et de gravité, par les BPCO (Bailey et al. 2008; Jouneau et al. 2012). Dans le Doubs, en milieu agricole fourrager, la prévalence de la bronchite chronique chez les actifs agricoles se situait en 1996 aux alentours de 10 %, et près de 6 % chez les non-fumeurs (Dalphin 1996). Selon une récente étude, le rôle des agents biologiques dans le développement de ces maladies ne peut être exclu (Eduard et al. 2009).

Les pneumopathies d'hypersensibilité sont des pneumopathies inflammatoires de mécanisme immunoallergique complexe, qui sont dues à l'inhalation chronique ou répétée d'une grande variété d'antigènes organiques ou chimiques de faible poids moléculaire (Bourke et al. 2001). Ces maladies, aussi appelées alvéolites allergiques extrinsèques (AAE), sont le plus souvent rencontrées en milieu rural où elles sont la conséquence d'expositions à des micro-organismes fongiques ou bactériens qui se développent dans des substrats organiques : c'est le cas de la Maladie du poumon de fermier, la Maladie des champignonnistes, la Maladie des ouvriers du bois ou des bûcherons, la Maladie des fromagers, le Poumon de compost, le Poumon du vigneron, l'Alvéolite au saucisson... (Bessot et al. 1997; Massin & Kolopp-Sarda 2004; Bünger et al. 2007). La Maladie du poumon de fermier est de loin la plus fréquente de ces AAE observées en milieu rural (Dalphin et al. 2005). Chez les fermiers en milieu de production laitière, où le risque est beaucoup plus important qu'en zone de culture céréalière, la prévalence en France se situe entre 0,2 et 1,5 % (Roussel et al. 2005). Bien que les pneumopathies d'hypersensibilité soient reconnues comme maladies professionnelles (INRS 2003), peu d'études de cohorte sur leur incidence ont été publiées. Diverses espèces de moisissures seraient impliquées dans les pneumopathies d'hypersensibilité dont le nombre d'agents étiologiques possibles ne cesse de s'accroître (Reboux et al. 2006).

A l'heure actuelle, il n'existe pas en France de Valeur Limite d'Exposition Professionnelle pour les bioaérosols microbiens (Duquenne & Greff-Mirguet 2005). Ceci s'explique principalement par le fait que l'on dispose de relativement peu de données sur la relation dose-effets de ces agents. Dans les environnements professionnels fortement contaminés, les concentrations en moisissures sont généralement comprises entre 10^4 à 10^8 spores/m³ d'air (Eduard 2009) ; alors que la concentration dans un environnement intérieur sans contamination fongique est généralement en dessous de 10^3 spores/m³ d'air (OMS 2009). Cependant, la répartition spatiale des espèces fongiques et leurs concentrations peuvent varier de façon extrême aux cours des activités professionnelles (Fulleringer et al. 2006;

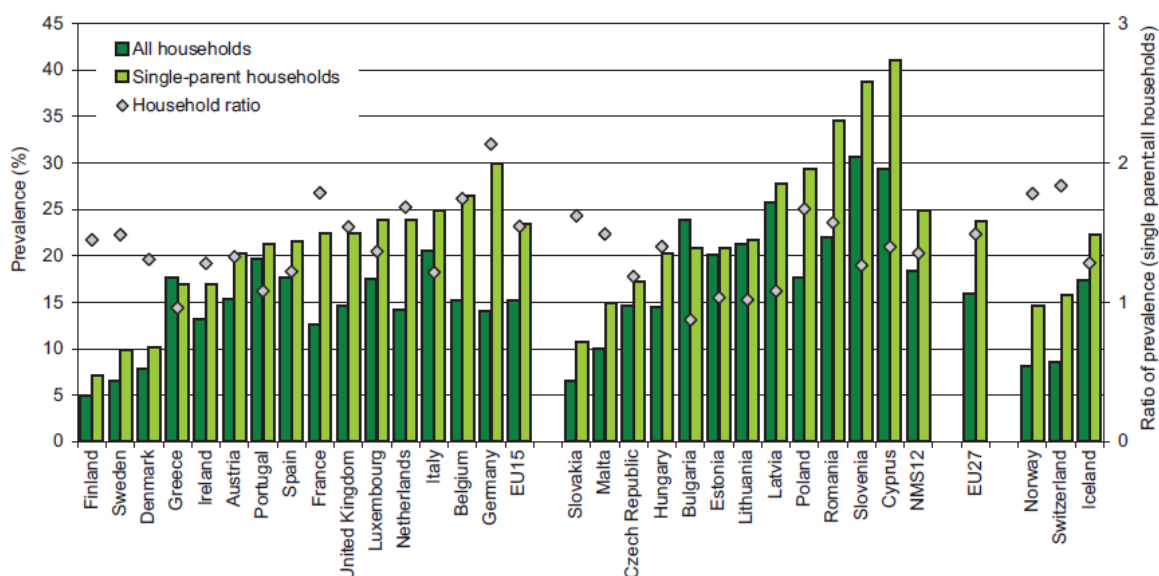
Lanier et al. 2010). Les méthodes de mesurage n'étant pas suffisamment standardisées, il reste difficile de comparer de façon objective les résultats issus d'essais différents (Duquenne & Greff-Mirguet 2005). Néanmoins, selon le contexte professionnel, l'exposition aux moisissures peut être contrôlée soit à l'aide d'un système de ventilation approprié, soit par des mesures destinées à limiter la propagation des moisissures, soit encore, à l'aide d'équipements de protection individuelle appropriés (INSPQ, 2002).

B. Les effets sanitaires des moisissures dans l'habitat

L'expression de « contamination fongique » fait référence, dans l'environnement domiciliaire, à la croissance non contrôlée de moisissures survenant sur des structures, des meubles ou autres matériaux habituellement exempts d'humidité, ainsi que dans le système de ventilation. Or, une contamination fongique peut survenir dans tout type de bâtiment réunissant les conditions favorables à la croissance des moisissures. Ainsi dans les logements, les concentrations de moisissures dans l'air et les niveaux d'exposition sont souvent variables.

Les logements humides et moisis

Une forte proportion de la population mondiale vit dans des logements où l'humidité est un problème de santé environnementale (OMS 2012). La prévalence de l'humidité excessive dans les bâtiments varie fortement selon les continents et les zones climatiques, et au sein même des pays. Elle serait de 10 à 50 % dans les environnements intérieurs en Australie, Europe, Inde, Japon et Amérique du Nord (OMS 2009). Par exemple, les résultats de quelques études réalisées au Canada font état de proportions variant de 14% à un peu plus de 30% d'habitations présentant des problèmes de moisissures ou d'humidité excessive (INSPQ 2002a). Les familles nombreuses vivant dans des conditions sociales défavorisées seraient particulièrement touchées (Butler et al. 2003), ainsi que les familles monoparentales (Figure 5). De plus, les individus ayant un faible revenu et les minorités ethniques souffriraient de manière disproportionnée des effets néfastes sur la santé liés à l'humidité et aux moisissures (Kohlhuber et al. 2006).



Source: data from EU-SILC, 2011.

Figure 5. Prévalence de l'humidité excessive dans les logements européens (OMS 2012)

En France, l'humidité reste de loin le problème de qualité de l'habitat le plus fréquent (Lalande 2010) : 20,4 % des ménages faisaient état de signes d'humidité sur des murs de leur résidence principale en 2006, loin devant les problèmes d'infiltrations d'eau (13 %). Ce défaut s'explique essentiellement par la vétusté de la construction (ancienneté de construction et état des façades et des huisseries) qui multiplie par six le risque par rapport aux logements récents et en bon état. Les conditions climatiques et météorologiques défavorables augmentent ce risque de près de 50% par rapport aux zones plus favorisées. En 2006, les propriétaires souffraient en moyenne deux fois moins de l'humidité que les locataires. Cependant, la présence d'humidité augmente significativement avec le nombre d'enfants du ménage de sorte que plus de 25% des enfants étaient exposés à ce défaut. La précarité énergétique est certainement un des facteurs expliquant ce phénomène sociétal. En effet, l'augmentation récurrente du prix de l'énergie affecte tout particulièrement le budget des ménages, mettant en difficulté certaines catégories socio-économiques qui ne peuvent plus assurer le chauffage de leur logement (Mandin et al. 2009). Les travaux d'isolation et la réduction de température se sont traduits dans de nombreux cas par une humidité accrue des logements, contribuant ainsi à la prolifération des moisissures. D'après la campagne nationale Logements menée par l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur, 37 % des logements français pourraient être contaminés par les moisissures (OQAI 2006). Une étude pilote en Ile de France a récemment montré que 17 % des logements enquêtés présentaient des moisissures visibles (Host et al. 2011).

Par ailleurs, l'humidité étant un critère d'insalubrité, cette problématique rejoint celle de l'habitat insalubre pour laquelle il y a une demande sociale et une implication des pouvoirs publics en France. En effet, la loi Solidarité, Renouvellement Urbain (SRU) a modifié et précisé certains articles du Code civil en introduisant la notion d'insalubrité. D'une façon générale, l'identification et la cotation de l'insalubrité se fait via des critères techniques (tels qu'une mauvaise ventilation, un éclairage insuffisant), car leurs répercussions sur la santé sont connus. Cependant les moisissures ne sont pas notées explicitement comme critères d'insalubrité. Ne disposant pas de critères mesurables, l'évaluation de l'insalubrité engendrée par le développement intempestif de moisissures repose essentiellement sur des critères sensoriels, et est donc considérée comme subjective (CSHPF 2006).

En 2009, le rapport de l'Organisation mondiale de la santé sur la qualité de l'air intérieur conclut que l'humidité excessive doit être considérée comme une grande priorité, car cela contribue à la détérioration de la santé des populations défavorisées qui sont déjà sujettes à diverses maladies (OMS 2009).

Les affections respiratoires chroniques

Sur la base de multiples études, l'OMS indique en 2009 qu'il y a suffisamment de preuves épidémiologiques concernant le risque accru de symptômes respiratoires, d'infections respiratoires et d'exacerbation de l'asthme, pour les occupants de bâtiments humides et/ou moisiss (OMS 2009). Plus récemment, Mendell et ses collègues ont effectué une revue bibliographique des effets sur la santé liés aux logements humides et/ou moisiss (Mendell et al. 2011) : de multiples associations positives [OR (IC 95%) > 1] ont été retrouvées (Tableau 4). Cependant les agents responsables de ces pathologies ne sont pas clairement identifiés (Tischer & Heinrich 2012).

Tableau 4 : Synthèse de 3 méta-analyses étudiant les effets de l'humidité et des moisissures dans les logements sur la santé humaine (Mendell et al. 2011)

Outcome	Subject groups	OR (95% CI)		
		Fisk et al. 2007 ^a	Fisk et al. 2010 ^a	Antova et al. 2008 ^b
Upper respiratory tract symptoms	All	1.70 (1.44–2.00)		
Cough	All	1.67 (1.49–1.86)		
	Adults	1.52 (1.18–1.96)		1.30 (1.22–1.39) ^c
	Children	1.75 (1.56–1.96)		1.50 (1.31–1.73) ^d
Wheeze	All	1.50 (1.38–1.64)		
	Adults	1.39 (1.04–1.85)		1.43 (1.36–1.49) ^e
	Children	1.53 (1.39–1.68)		1.49 (1.28–1.74) ^f
Current asthma	All	1.56 (1.30–1.86)		
Ever-diagnosed asthma	All	1.37 (1.23–1.53)		
	Children			1.35 (1.20–1.51)
Asthma development	All	1.34 (0.86–2.10)		
Bronchitis	All		1.45 (1.32–1.59)	
	Children			1.38 (1.28–1.47)
Respiratory infections	All		1.44 (1.31–1.59)	
	Adults		1.49 (1.14–1.95)	
	Children		1.48 (1.33–1.65)	
Respiratory infections ^g	All		1.50 (1.32–1.70)	
Sensitivity to inhaled antigens	Children			1.33 (1.23–1.44)
Hay fever	Children			1.35 (1.18–1.53)

L'augmentation des prévalences d'asthme et d'allergies dans de nombreux pays se traduit par une augmentation du nombre de personnes sensibles aux effets de l'humidité et des moisissures dans les bâtiments (OMS 2009). Deux grandes études multicentriques, l'une européenne chez l'adulte (ECRHS) (Janson et al. 2001), et l'autre internationale chez l'enfant et l'adolescent (ISAAC) (Beasley 1998), ont évalué la prévalence des maladies allergiques : près de 30 % de la population est atopique, 5 à 10 % étant atteints d'asthme et un peu plus de 20 % de rhinite allergique. A la fin des années 90, la prévalence de la rhinite allergique cumulative française était de 7 % parmi les enfants, 15 % parmi les adolescents et de 31 % parmi les adultes (Annesi-Maesano 1998). Une étude plus récente confirme la forte prévalence de cette pathologie en Europe de l'Ouest et indique que les rhinites allergiques sont fréquemment non diagnostiquées (Bauchau & Durham 2004).

En France, selon l'Enquête santé protection sociale menée par l'Institut de Recherche et Documentation en Economie de la Santé (IRDES) en 2006, la prévalence globale de l'asthme est estimée à 6,7 %, soit 4,15 millions de personnes asthmatiques (Afrite et al. 2011). La rapidité de l'augmentation de la prévalence au cours des dernières années suggère une influence plus importante des facteurs environnementaux que des facteurs génétiques sur l'expression des maladies allergiques (Migueres et al. 2009). D'après des données provenant de 45 pays, il a été estimé que 69 462 années de vie ajustées sur l'incapacité (DALYs) due à l'asthme chez des enfants européens (de 0 à 14 ans) seraient associées à l'exposition à l'humidité dans les logements (pour une prévalence d'exposition

de 15%) (Braubach et al. 2011). De même, pour une prévalence de 10%, 55 842 *DALYs* seraient associées à l'exposition aux moisissures.

Cependant, puisque les relations entre humidité, exposition microbienne et les effets sur la santé ne peuvent être quantifiées précisément, aucune valeur guide quantitative ne peut être recommandée pour des niveaux acceptables de contamination microbienne dans les environnements intérieurs (OMS 2009).

III. Mesure de l'exposition fongique en environnement intérieur

L'exposition aux moisissures en environnement intérieur est à l'origine de plusieurs enjeux de santé publique. Au cours de cette thèse, une revue critique de la littérature a permis de faire la synthèse des besoins et des méthodes fréquemment utilisées pour évaluer l'exposition fongique dans trois environnements différents : les hôpitaux, les logements et les lieux de travail (Article 1).

A. Un constat majeur : Le besoin d'outils quantitatifs

Afin d'évaluer le risque fongique dans les environnements intérieurs, il est nécessaire de quantifier l'exposition des occupants. Néanmoins, les besoins en termes de mesures diffèrent selon le contexte environnemental. A l'hôpital, des outils très sensibles sont nécessaires pour contrôler l'efficacité des mesures de prévention mises en place dans les zones à risque infectieux. Des dispositifs capables de mesurer des concentrations élevées en moisissures sur des lieux de travail sont requis pour identifier les agents étiologiques des maladies professionnelles et pour établir des valeurs limites d'exposition. Enfin, dans les logements, différentes stratégies de mesures ont été proposées pour détecter le développement anormal de moisissures, mais il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode reconnue par l'ensemble de la communauté scientifique pour mesurer quantitativement l'exposition aux moisissures (OMS 2009).

Bien que différentes méthodes de mesures aient été développées pour détecter des spores ou des composés fongiques spécifiques, il n'y a pas de consensus général sur la meilleure méthode (Eduard 2009). De plus, les techniques existantes ne sont généralement pas totalement caractérisées et un effort de standardisation est encore nécessaire pour pouvoir comparer les résultats obtenus par différents opérateurs avec une même technique (CSHPF 2006; Duquenne & Greff-Mirguet 2005). Ainsi, plusieurs rapports concluent que davantage de recherche est nécessaire pour mettre au point des méthodes de mesures quantitatives de l'exposition aux moisissures (InVS 2005; OMS 2009).

B. Discussion sur les méthodes fréquemment utilisées

Que ce soit à l'hôpital, dans les logements ou sur les lieux de travail, la mesure de l'exposition aux moisissures nécessite une étape d'échantillonnage, puis une étape d'analyse pour caractériser et/ou quantifier la flore fongique et ses composés fongiques. Des méthodes communes ont été identifiées dans ce travail bibliographique, mais certaines pratiques sont spécifiques aux environnements étudiés (Article 1).

Trois grands types de prélèvements sont fréquemment effectués en environnement intérieur :

- Les prélèvements d'air peuvent être effectués par différents systèmes de collection (systèmes à impaction, collecteurs cycloniques, systèmes de filtration). Les volumes d'air prélevés diffèrent généralement selon le niveau de contamination fongique de l'environnement et l'objectif de l'étude (prélèvement ponctuel dans le cadre d'une surveillance environnementale, ou mesure représentative d'une exposition sur le long terme).
- Les prélèvements de surface avec des boîtes contact gélosées ou des écouvillons sont souvent utilisés dans le domaine hospitalier pour vérifier l'efficacité des mesures de prévention et de nettoyage-désinfection. L'application directe d'un ruban adhésif sur une surface permet aussi de déterminer si une tâche suspecte dans un bâtiment correspond à un développement fongique.
- Les poussières sont fréquemment prélevées sur des surfaces horizontales des logements ou des lieux de travail, car elles sont représentatives d'une exposition fongique passée.

La méthode culturale est l'approche traditionnelle pour quantifier les moisissures quelque soit l'environnement étudié. Le type de milieu de culture et les conditions d'incubation diffèrent néanmoins selon les études. Au cours des dernières décennies, les techniques d'analyses ont bénéficié de l'essor général des techniques microbiologiques. Ainsi, les micro-organismes ne sont plus seulement dénombrés au microscope ou après culture, mais quantifiés au moyen de techniques moléculaires, immunologiques et biochimiques. Les techniques basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), se sont fortement répandues dans les études environnementales, et de nombreux outils ont été développés depuis les années 2000 pour quantifier en temps réel les moisissures. Des outils immunologiques sont aussi utilisés dans des études épidémiologiques pour mesurer les allergènes fongiques dans les échantillons environnementaux. Cependant, une des principales difficultés de cette technique est le manque de standardisation des extraits allergéniques fongiques. Des techniques ont aussi

été développées pour mesurer des composés présents dans la paroi ou la membrane des champignons, tels que les β -1,3-glucanes ou l'ergostérol. Enfin des techniques de chromatographie permettent la détection de mycotoxines ou de composés organiques volatils d'origine microbienne.

Comme l'illustre la figure de l'article 1, deux grandes approches peuvent être distinguées parmi les techniques analytiques. L'une tend à quantifier la contamination fongique dans son ensemble après avoir collecté des particules fongiques de l'environnement. L'autre vise à quantifier des composantes fongiques spécifiques qui sont potentiellement responsables d'effets cliniques. Cependant le rôle des moisissures sur la santé humaine reste complexe et difficile à appréhender dans sa globalité.

C. **Revue critique de la littérature**

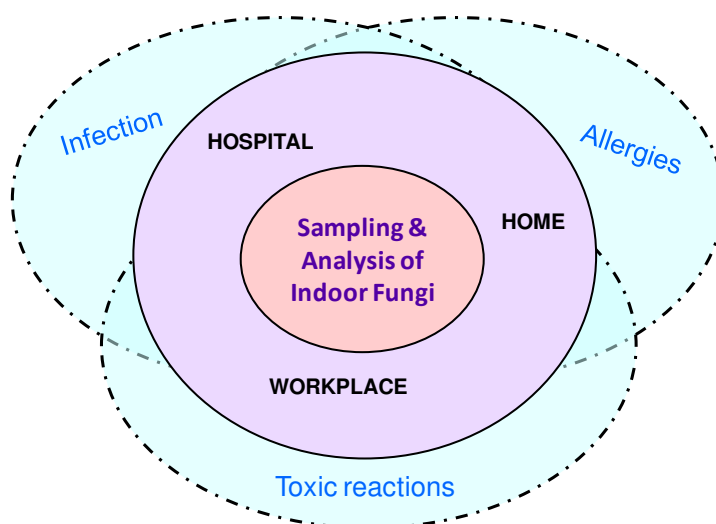
Indoor fungal contamination: health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces (Article en préparation)

Indoor fungal contamination: health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces

ABSTRACT

Indoor fungal contamination has been associated with a wide range of adverse health effects with a major impact on public health, including infectious diseases, toxic effects and allergies. The diversity of fungi and fungal agents contributes to the complex role that they play in indoor environments and human diseases. Mold can cause significant health risks with different consequences in hospitals, homes and workplaces. This review presents the methods used to assess fungal contamination in these various environments, and discusses advantages and disadvantages for each method in consideration with different health risks. Air, dust and surface sampling strategies are compared, as well as the limits of various methods used to detect and quantify fungal particles and fungal compounds. In addition to conventional microscopic and culture approaches, more recent chemical, immunoassay and PCR-based methods are described. This article also identifies common needs for future multidisciplinary research and development projects in this field, with specific interests on viable fungi and fungal fragment detections. Future perspectives with the next-generation sequencing methods are finally discussed.

TOC Art



INTRODUCTION

For some years, concern about human exposure to microorganisms in indoor environments has focused on fungi. Interest in bioaerosol exposure has increased significantly because it is now recognized that exposure to fungal agents is associated with a wide range of adverse health effects with a major impact on public health. As people in modern society spend 80% or more of their time indoors (1), many methods have been developed to assess indoor fungal exposure.

Various indoor environments are concerned by fungal health risk. Improved insulation of buildings combined with poor ventilation has generated environments that favor the growth of mold and several studies have suggested that a significant proportion of the occurrence of building-related diseases is associated with exposure to mold (2–6). According to the World Health Organization guidelines on indoor air quality (7), occupants of damp or moldy buildings have up to 75% greater risk of respiratory symptoms and asthma. Significant fungal exposure also occurs in agricultural and industrial activities and may cause occupational respiratory diseases (8). In hospitals, the prevention of nosocomial fungal infections is currently based on air-control measures with monitoring fungal contamination (9).

Fungi can affect human health in a variety of ways such as infections, allergic reactions (sensitization and immune overreaction) and toxic reactions (10; 11). Fungal infections range from superficial to invasive infections. For example, invasive aspergillosis is a life-threatening infection in neutropenic patients but also occurs in patients with chronic pulmonary diseases and/or undergoing corticosteroid treatment (12; 13). Exposure to mold can cause allergic reactions in fungal-sensitive individuals, who account for about 10% of the total population and 40% of patients with asthma (14; 15). Toxic reactions are mainly caused by mycotoxins which are secondary fungal metabolites, (16; 17) but components of fungal cell wall, such as (1→3)- β -D-glucans (18), have also been reported as having a causal role. In addition, exposure to volatile organic compounds (VOC) produced by fungi growing on and degrading substrates may be responsible for nonspecific symptoms, such as headaches; eye, nose and throat irritations and fatigue (19). This wide range of chemical byproducts is partly carried in indoor air by fungal fragments and spores. The biological mechanisms as well as the causative factors related to the effects of fungi on human health remain nevertheless unclear.

To deal with the complexity of the diverse effects of mold on health, many measurement strategies have been developed to assess indoor fungal contamination.

Although hospitals are very different from home and agricultural environments (in terms of fungal contamination and biodiversity), there may be similarities in sampling and analysis methods. In this article, an overview is provided on the health effects associated with fungal exposure in these three environments. In addition, a comprehensive description of fungal exposure assessment methods used over the last decade is presented. Advantages and disadvantages for each method are presented in consideration with different health risks in hospital, home and workplaces. This review also identifies technical challenges in fungal measurement, with specific interests on viable fungi and fungal fragment detections. Finally, the potential use of enhanced fungal monitoring with the next-generation sequencing methods is discussed.

ENVIRONMENTAL AND PUBLIC-HEALTH ISSUES

Control of fungal environmental risk in hospitals

Fungal infections are a public health issue in hospitals. Aspergillosis is the most significant opportunistic disease in immunocompromised patients: this fungal infection is caused primarily by *Aspergillus fumigatus*, but also to a less degree by *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* and *A. terreus* (20; 21). Other fungi causing respiratory infections include *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia* and *Fusarium* (22; 23). Exposure to these environmental fungi occurs through inhalation of air (24) or aerosolized droplets of water, e.g. during a bath or shower (25; 26). Despite improvements in diagnosis and treatment, invasive fungal infections are often fatal; the mortality rate remaining around 50% for invasive aspergillosis (27).

Preventive measures are, therefore, taken in operating rooms and in high risk units. In particular, high efficiency particulate air (HEPA) filtration systems and rooms with laminar airflow are needed in hematology wards to minimize ambient fungal spore concentrations (28; 29). An environmental surveillance program is often implemented in hospitals in order to eliminate opportunistic fungi detected in these high risk areas as rapidly as possible (30–32). Although the strategies developed to prevent invasive fungal infections are costly, these are widely adopted given the high cost of diagnosing and treating these often fatal diseases. Specific protective measures against contamination must be taken when building work is being carried out on hospital sites, such as keeping rooms, ward doors and windows closed, reinforcing disinfection and using air treatment systems (33; 34).

Detection of abnormal mold development at home

Indoor fungi in housing may cause adverse effects, both on buildings and residents. In addition to damaging materials in the home, they can render a building unpleasant to live in by looking and smelling bad (35). A meta-analysis indeed suggested that dampness and mold in buildings are associated with increases of 30-50% in a variety of respiratory disorders in a variety of populations (36). It was recently showed that early exposure to molds significantly increased the risk for asthma at 7 years of age (37). Indoor fungi may also be an important factor in the development of sick building syndrome (5; 38; 39). Detection of abnormal fungal development in homes is essential to assess the exposure of atopic individuals predisposed to respiratory diseases, but also of non-atopic individuals. Detection of viable fungi responsible for invasive fungal infection in dwellings is useful for assessing the risks to immunosuppressed patients at home, because an increasing number of chemotherapy protocols have a short-stay, and so the immune system is not completely restored on release from hospital.

The fungal diversity in homes is high, but *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* and *Penicillium* species are frequently found in this environment. The main mold growth factors in dwellings are water infiltration or leakage, poor insulation, thermal bridges, condensation and lack of ventilation.

Fungal exposure has been assessed by questionnaire in numerous studies. However, this method is likely to give biased results, especially when inhabitants with respiratory problems fill in the documents (36; 40; 41). In many studies, questionnaires are administered by trained interviewers who also report dampness signs and visible molds. However, these criteria are not necessarily sufficient, because fungal development may be hidden in building materials or ventilation systems. Objective and quantitative tools are, therefore, required to assess exposure to molds in homes.

Assessment of the fungal risk in the workplace

There is growing public awareness regarding the risk associated with poor indoor air quality in the workplaces. Exposure at work to dampness and molds was associated with the occurrence of new-onset asthma (42). In agricultural environments, the respiratory system is particularly exposed to many inorganic and organic agents which may cause or exacerbate asthma, mucous membrane irritation and chronic bronchitis (43–47). Farmers are known to be at high risk of developing occupational airway disease. Common molds such as *Absidia corymbifera*, *Eurotium amstelodami* and *Wallemia sebi* are implicated in Farmer's lung disease, the most common form of occupational hypersensitivity pneumonitis (48).

Occupational airway disease can occur in many different environments and so a wide variety of fungi may be implicated (49). For example, bioaerosols released by the waste recycling and composting industry are a recent cause of concern because of their potential impact on the health of workers (10; 50; 51).

In these workplaces, exposure to mycotoxins is mostly by ingestion, but also occurs by the dermal and inhalation routes. Some mycotoxins are known carcinogens (ochratoxin, aflatoxin, etc) that may, for example, be inhaled in food and animal feed industries (17). High spore concentrations of *Wallemia sebi*, known to produce a toxic metabolite (walleminol A), may also be found in hay and grain storage facilities and stabling (52). However, little is known about inhalation and limits for the concentration of airborne mycotoxins and these compounds are rarely monitored in these environments.

Airborne fungal concentrations in farming environments are not easily measured owing to very high concentrations (10^3 to 10^{10} CFU/m³). An exposure level of about 10^5 spores/m³ has nevertheless been associated with respiratory troubles (53). A microbiological assessment of the environment contributes to the diagnosis and treatment of occupational airway diseases by identifying both the circumstances of exposure and the sources involved (54).

Indoor fungal contamination is a public health concern that may affect various populations (patients, residents, workers) depending on the context and the individual susceptibility. There are many adverse health effects with differing degrees of severity. Fungal concentration and diversity depend on the specific characteristics of the indoor environment and so the aim of sampling for fungi may vary, as well as the techniques used to detect fungal contamination.

ENVIRONMENTAL SAMPLING TECHNIQUES

The main reason for collecting samples when fungal contamination is suspected is to detect, quantify and identify any fungi that might be present (35). Before starting a survey, certain essential factors should be established and evaluated: the reasons for undertaking the inspection, the types of fungi being looked for, the sampling frequency and the places to be sampled. In hospitals, samples are usually taken in areas with air-treatment systems where the presumed level of aerobiocontamination is very low (such as wards with high efficiency filtration and operating rooms) (55). In housing studies, the places where samples are taken depends either on the time spent in a room (bedroom or living room) or on the presence of high humidity (bathroom or kitchen) (41; 56; 57). In workplaces, the scope of the sampling

strategy should take account of the symptoms of the workers and their occupations.

Air sampling

As molds are associated with diverse respiratory disorders, air sampling is often performed in indoor environments (Table 1). For example, it is useful for determining whether the air in homes or workplaces is microbiologically normal or atypical, by comparison with data from other groups of homes or workplaces. Air is also sampled in hospitals as part of surveillance programs. Bioaerosol sampling may be carried out by impaction onto a culture plate inserted into the sampling device or by impingement into a liquid medium. Impaction sampling durations of 1-10 min are appropriate for avoiding media dessication (58). The use of impingers is a flexible method for producing samples for a range of laboratory techniques for analysis. Pre-sterilized cassettes with filters can be used for personal or area air sampling, especially in working places to assess individual exposure. Filtration methods allow long-term measurements and are applicable during normal activities in the room and when major air movements and fluctuating mold concentrations are to be expected. Sampling volumes are usually adapted to the level of fungal concentration. They are, therefore, higher in hospitals (usually 500 L or 1 m³) with low presumed levels of biocontamination than in workplaces where lower volumes will avoid saturating the sample by impaction (usually <300 L) (Table 1). Sampling conditions (air flow rate and sampling time) vary hugely depending on the type of sampler and the environment. The use of high-volume centrifugal or cyclonic samplers is increasing: they often operate at greater than 300 L.min⁻¹. The design of the air samplers is known to influence their efficiencies for measuring airborne microbial concentrations (59). As limited information is usually available about their overall performance, comparisons of different bioaerosol samplers in field conditions are useful to assess their performance (60–62).

Surface sampling

Surface sampling can determine whether a mark on a wall has resulted from fungal growth or some other cause. It can also assess the effectiveness of remediation and clean-up of indoor environments. Direct microscopic analysis of tape lift samples can provide a semi-quantitative determination of the genera and number of spores present (63; 64). A cotton swab can also be used for subsequent culture and molecular analyses (57; 65). In homes, surface samples are obviously positive if they are taken from moldy areas but can be used to determine the fungal diversity of the sampled areas. In hospitals, surfaces are sampled in addition to air sampling, in order to

optimize the sensitivity of surveillance in areas that are presumed to have low contamination. The method must be standardized. It has been proposed for example that 5cmx5cm areas should be sampled systematically on various sites (basin, air extraction grille, television, etc), in order to determine the contamination kinetics during long-term surveillances (9). Direct application of culture media is also a common method in hospitals (28; 66).

Dust sampling

Dust can be analyzed to determine the presence of fungi or fungal agents that have accumulated over time, as it provides an indication of the microbial agents that may have been airborne (Table 2). The term “settled dust” is often used to describe the particulate matter that collects on horizontal surfaces, primarily floors. Over a defined time period, suction devices or vacuum cleaners can be used to collect dust from a given area of carpets or hard floors in homes (usually 1 to 2 m²). This approach is also useful following moisture damage and/or health complaints in workplace investigations. Furthermore, analysis of dust in ventilation ducts could be a practical indicator of the air treatment efficiency in hospitals. One of the main advantages of dust sample is that this matrix may be analyzed by different techniques (Table 2). However, variables such as the type of carpet, vacuum cleaner capture velocity and relative humidity, can affect how well dust is removed from the floor (67). Besides, the respirable fraction of the dust and the length of the dust accumulation are not known. Passive airborne dust collection methods, such as electrostatic dust collectors, may thus be a low-cost means of assessing long-term fungal exposure in standardizing the time and the surface of dust accumulation (68–70).

Sampling strategies vary according to the indoor environment. Surface and air sampling are generally used in hospital to confirm that the care environment is safe, especially in Europe. They are also useful in houses to quantify the exposure and evaluate the biodiversity. Dust is more often sampled in homes because it is an indicator of the past fungal exposure. Although techniques differ slightly depending on the level of fungal contamination, air sampling is the most commonly used technique in indoor environments, as it provides a better characterization of the airway exposure.

ANALYTICAL METHODS

Depending on the objective of the investigation, environmental samples are analyzed to detect either fungal particles or specific fungal compounds (Figure 1). On the one hand, spores and/or fungal fragments may be detected to assess fungal exposure with a global approach. On the

other hand, cell components and metabolites of molds known to be associated with adverse health effects may be specifically quantified to characterize the fungal risk.

Microscopic analytical methods

Microscopic evaluation of tape-lift samples may provide indications as to whether the mold growth in a wall is fresh or desiccated and historic. Microscopy is also performed to identify and enumerate airborne fungal spores collected by spore-trapping samplers (71). This technique is frequently used for outdoor air quality surveys and also has been used in a few indoor air studies (72–74). Both dead and living microorganisms are quantified by this method (18). However, identification of the fungal spores is often difficult: only a small number of fungal spore types can be identified with confidence at generic level, and significant genera such as *Aspergillus* and *Penicillium* cannot be differentiated. This method also has the disadvantages that the procedures are laborious and complicated, and the cost per sample is high.

Culture-based methods

Culture-based methods can provide quantitative and qualitative data on viable and culturable fungi from nearly all types of sample. Results are nevertheless influenced by many factors, particularly incubation conditions (such as culture medium, temperature) and competition between species. Malt Extract Agar (MEA) has a high sugar content and water activity favoring fast-growing species, whereas Dichloran Glycerol (DG18) allows more diversity but does not support the growth of some fungi because of its low water activity (75; 76). Bacterial contamination can be reduced by the addition of chloramphenicol. Sabouraud media are usually incubated at 30–37°C to detect fungal pathogens in hospital samples, whereas MEA and DG18 media should be incubated at temperatures below 28°C for home and workplace samples (Table 3).

Although culture-based analysis is one of the most economical ways of identifying molds at species level, it generally requires at least a seven-day incubation period and needs to be undertaken by qualified personnel. Non-viable and non-culturable fungi are not detected by this method, although these can be allergenic and/or irritant. Besides, many studies showed that concentrations of some species were 10 to 10³ times higher when quantified by molecular methods than when assessed by culture methods (52; 77; 78).

PCR-based methods

The use of molecular techniques to study microorganisms in the environment has increased significantly with PCR amplification and DNA sequence analysis to detect and identify microorganisms (79).

Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) is a fast method for specific identification and quantification of viable and non-viable fungal agents, and is being used more frequently owing to its low detection limit and high accuracy. Contamination of samples during analysis can nevertheless be challenging, because of the method's high sensitivity. Its major advantage is that it can provide quantitative information quickly over a wide range of numbers (10 to 10¹⁰), from species level to a general group of microorganisms (80; 81).

A DNA-based mold analysis method, called Mold specific quantitative PCR (MSQPCR), was created for about 130 molds (82). A national dust sampling and analysis campaign using MSQPCR in US homes produced a scale for comparing the mold burden in homes called the Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) (83), which was useful for the characterization of homes of severely asthmatic children (84). It was shown that early exposure to molds as measured by ERMI at 1 year of age significantly increased the risk for asthma at 7 years of age (37). Fungal primers and probes sequences designed by scientists of the United States Environmental Protection Agency has been used in many studies in hospitals (30; 85–87), in homes (88–90), in shopping centers (91) and in day care centers (65). Other sequences were developed and used in agricultural environments (52; 92), and more recently in hotel rooms (93).

Cytometry methods

Few studies have applied cytometry methods for the detection of fungi in indoor environments. A flow cytometry technique was tested to detect fungal propagules labeled by fluorescence in situ hybridization (94). In this study, propidium iodide was used as fluorescent intercalating agent to stain DNA. As this molecule is not specific for fungi, multiple parameters were used to differentiate fungal propagules from different cells and biotic debris in field samples. Solid-phase cytometry (SPC) may also be useful to quantify fungal spores in environmental samples (95). By combining flow cytometry and epifluorescence microscopy principles, this technique yields results within a few hours of sampling and has a highly dynamic detection range. New approaches in SPC based on immunofluorescent labeling may allow a detection of specific fungi. For example, Vanhee et al. developed a protocol using monoclonal mouse anti-*Aspergillus* antibodies for the quantification of *Aspergillus fumigatus* in air samples (96).

Chemical and immunoassay methods

Cell wall components

Chemical methods for measuring total fungal exposure have been developed in order to automate fungal analysis. Ergosterol measurements are used in many studies as an index of fungal biomass, as this is the major sterol in cell membranes of hyphae and spores. However, it gives no information on the species present (35). Ergosterol is generally analyzed by liquid phase chromatography (97) or by high-resolution gas chromatography / mass spectrometry (87; 98; 99). (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan is a biologically active constituent of the fungal wall that has been shown in several studies to be related to respiratory health disorders (18). The *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) test for detecting glucans is an extremely sensitive method and quantities as small as a few picograms (a few tens of fungal spores) can be detected (100–102). The glucan content has been shown to vary according to the fungal species and to be proportional to the spore surface area (103; 104). Glucans are not specific to molds and are also present in vegetable cells (including pollen) and some bacteria (105). Several epidemiological studies have reported that glucans have strong immuno-modulating effects. Thus the exposure to glucans is often assessed in homes (98; 106) and workplaces (107; 108).

Microbial volatile organic compounds

Microbial Volatile Organic Compounds (MVOCs) produced by fungi growing on and degrading substrates may be responsible for nonspecific symptoms, such as headaches; eye, nose and throat irritations and fatigue (19). More than 500 different MVOCs have been identified (109). Sampling methods usually involve capture onto carbon-based or TENAX adsorbents, followed by gas chromatography / mass spectrometry in the laboratory (72; 110). The substratum on which the fungi grow and the environmental conditions were reported to influence the production of MVOCs in various studies (111). Until now, the use of MVOCs as fungal markers has often been hampered by the low levels of emission from molds and by the lack of specificity of most of the compounds emitted (112–115). It has been suggested that MVOC analysis could rely on the detection of several compounds forming characteristic patterns (112; 116). An index of fungal contamination based on MVOC measurements was recently used to evaluate exposure of French population to molds at homes (117).

Mycotoxins

Mycotoxins are secondary fungal metabolites that cause a toxic response at low doses in vertebrates (17; 118). Most are non-volatile with a molecular weight below 1500 Da (16). In agricultural settings, mycotoxicosis in both

farm animals and humans can result from oral or dermal exposure or inhalation of mycotoxin-contaminated grain or dust. Five major mycotoxins are found in agricultural environments: aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, deoxynivalenol and zearalenone (17; 119; 120). Fungal isolates from water-damaged buildings may also produce highly cytotoxic trichothecenes and sterigmatocystin, which may induce health problems upon inhalation (115). However, in vitro experiments showed that metabolite production is influenced by medium composition, temperature and water activity, indicating that molds are likely to generate different metabolites when they grow on building materials (16). In the last decade, public concern has increased over the potential health risks in indoor environments associated with the *Stachybotrys chartarum* species whose mycotoxins can inhibit protein synthesis and induce hemorrhaging disorders (121). Identification and measurement of mycotoxins require advanced analytic instrumentation, such as gas chromatography / mass spectroscopy and liquid chromatography / mass spectroscopy (115; 122; 123). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and array biosensors have also been developed (124; 125).

Allergens

Application of immunoassays in ecological and human exposure monitoring for indoor allergens is increasing. In 2000, a double immunostaining technique called halogen immunoassay (HIA) was developed to immuno-label the “halo” of allergen around particles by using either allergen-specific monoclonal antibodies or human immunoglobulin E (126). HIA may have clinical applications in quantifying personal exposure as well as identifying allergens (127). Many key issues including sources of assay variability and the loss of assay specificity due to immunological cross-reactivity among fungi need to be resolved before immunoassays can be used on a routine basis for exposure and health assessment studies (128). Their current application for monitoring purposes of fungi is partly limited because of the problems associated with antibody specificity. Even phylogenetically distant species such as *Cladosporium* and *Stachybotrys* or *Wallemia* were found to share multiple epitopes with *Aspergillus* and *Penicillium* species (129). Some authors therefore recommend that accurate and quantitative monitoring assays for fungi should be developed with species-specific monoclonal antibodies (130). Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) results for fungal aerosols were moreover found to be influenced by differential sample processing and thus method standardization is essential to maintain the comparability of immunometric monitoring results (130).

Although culture-based methods are the traditional approach in mycology, more recent methods such as chemical, immunological and PCR-based methods are frequently used in indoor environmental studies (Figure 1). All these techniques have specific advantages and limits and so there is no “gold standard method” for assessing fungal contamination. Several authors suggest that combined sampling and analysis methods should probably be used to produce a more comprehensive picture of indoor fungal flora (57; 87; 131). However, methodological challenges still have to be overcome before these complementary approaches can be developed.

TECHNICAL CHALLENGES AND OUTLOOK

Mold viability: Still an essential information?

In certain environments, such as in high risk units of hospitals, the viability of a microorganism is a critical factor since it determines infectivity. Fungal spores can remain viable for a short period or for many years, depending on the fungal species, type of spore and storage conditions. However, no common analysis method can be considered perfectly accurate for detecting only live cells (132). With culture-based methods, there is the well described phenomenon of viable but non-culturable cells (133). Although qPCR provides a faster, more sensitive method than culture-based techniques for testing environmental samples, it does not differentiate between viable and non-viable cells without a pre-treatment step. Samples may indeed be treated with propidium monoazide, which is compatible with qPCR techniques, to discriminate between live and dead fungal cells (132). A cytometry method was also developed to label fungi with a viability substrate (95; 133). A precise identification of a specific fungus detected by this technique is nevertheless not possible without complementary methods. These methods can help to determine the ratio of dead to viable fungi and contribute to the assessment of the fungal infectious risk and to setting up preventive measures in hospital environments. However viability is not a necessary requirement for the development of noninfectious diseases, since allergens and toxins are also present in dead cells.

Fungal fragments: An underestimated reservoir of allergens?

Several field studies have shown that the concentration of airborne fungal spores in mold problem buildings is not necessarily higher than in healthy buildings (134). This suggests that spores may not be the only agents contributing to adverse health effects in damp indoor environments. Large quantities of smaller-sized fungal fragments (< 1 µm) are released together with spores from

contaminated surfaces (135; 136). These fragments, which are probably pieces of spores and fruiting bodies, can be easily transported by air currents and more efficiently deposited in the lower airways than intact spores (137; 138). Their clinical significance is not really known. However, exposure to fine particles in ambient air has been associated with several adverse health outcomes, including respiratory and cardiac symptoms. The high number of released fungal fragments in combination with their potential to deliver harmful antigens and mycotoxins to the alveolar region of the lung, especially for young children, suggest that exposure assessments need to take account of fungal fragments (11; 137; 139). For example, airborne *Stachybotrys chartarum* trichothecene mycotoxins were detected in fungal fragments, separated from conidia by means of filters with decreasing pore size (140). There is increased interest in the role of aerolized fungal fragments following reports that the combination of hyphal fragments and spore counts improved the association with asthma severity (141). Seo et al. suggested a new methodology to separate and analyze fungal fragment samples (104). But technological developments should be continued to provide realistic and comprehensive exposure profiles in homes and workplaces, because traditional bioaerosol sampling and analysis methods cannot detect these fine and ultrafine particles.

Sequencing technologies: The next revolution in fungal risk assessment?

Unlike many chemical agents, there are no thresholds for acceptable levels of fungal agents in indoor environments. More research is needed to understand the complex role fungi play in human diseases. As people are exposed to multiple fungal agents (Figure 1), it is still difficult to globally apprehend the fungal risk. The traditional culture-based methods greatly limit our view of the diversity and quantity of microbial material in environmental samples. Although PCR-based methods have been increasingly used during the last decade, they only detect specific fungi known to be present in indoor environments. The recent introduction of DNA sequencing by synthesis technology promises thus to revolutionize the global understanding of aerosol science (142). The automated Sanger method is considered as a ‘first-generation’ technology, and newer methods are referred to as next-generation sequencing (143). The inexpensive production of large volumes of sequence data is the primary advantage of high-throughput technologies. These new technologies can be expected to have a tremendous effect on fungal biodiversity and ecology research. Only about 5% of the estimated 1.5 million species of extant fungi have been described, and sequence data are available

for about 1% of the hypothesized number of fungal species (144). At present, the large amount of sequence data obtained with high-throughput sequencing techniques contrasts with the lack of high-quality reference sequences with sufficient taxonomic information. Identification procedures of fungi need indeed to be adapted to the emerging demands of modern large-scale ecological studies. It was also shown that the alternative primers, DNA extraction methods and PCR replicates strongly influenced the richness and community composition as recovered by pyrosequencing (145). Despite these technical challenges, sequencing technologies have potentials for characterizing fungal risk in indoor environments. In medical context, an accounting of pathogen exposure can be made that includes the multiple agents that are present, rather than single agents selected prior to sample analysis (142). In home or workplace studies, similarities and differences between populations from different environments can be determined. Another sequencing strategy includes the production of a “metatranscriptome”- a list of transcribed genes, in a particular sample. Some important applications include gaining insights into how organisms regulate pathogenicity/toxin genes (142). In a near future, these new high speed sequencing technologies should thus enable our understanding of the indoor environments and of the fungal effects on human health.

In conclusion, exposure to fungal agents is still a public health issue in various indoor environments (hospitals, homes, workplaces). Improving quantification of fungal compounds and particles, as well as increasing the throughput of sampling and analysis techniques, are important future directions in fungal exposure assessment. However, only an interdisciplinary approach will improve research with methods that can be readily transferred from one discipline to another. Public-health, aerosol and environmental science should be brought together into the study of indoor fungal contamination to ensure that the strategy and tools used meet the challenge.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a EHESP’s Doctoral Network Fellowship. The authors declare that there are no conflicts of interest.

LITERATURE CITED

(1) Bernstein, J. A.; Alexis, N.; Bacchus, H.; Bernstein, I. L.; Fritz, P.; Horner, E.; Li, N.; Mason, S.;

Nel, A.; Oullette, J.; Reijula, K.; Reponen, T.; Seltzer, J.; Smith, A.; Tarlo, S. M. The health effects of nonindustrial indoor air pollution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2008**, 121(3), 585-591.

(2) Douwes, J.; Thorne, P.; Pearce, N.; Heederik, D. Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects. *Ann. Occup. Hyg.* **2003**, 47(3), 187-200.

(3) Bornehag, C.-G.; Sundell, J.; Sigsgaard, T. Dampness in buildings and health (DBH): Report from an ongoing epidemiological investigation on the association between indoor environmental factors and health effects among children in Sweden. *Indoor Air* **2004**, 14(s7), 59-66.

(4) Singh, J. Review: Occupational Exposure to Moulds in Buildings. *Indoor Built Environ.* **2001**, 10(3-4), 172-178.

(5) Crook, B.; Burton, N. C. Indoor moulds, Sick Building Syndrome and building related illness. *Fungal Biol. Rev.* **2010**, 24(3-4), 106-113.

(6) Reboux, G.; Bellanger, A.-P.; Roussel, S.; Grenouillet, F.; Millon, L. Moulds in dwellings: Health risks and involved species. *Rev. Mal. Respir.* **2010**, 27(2), 169-179.

(7) World Health Organization. WHO Guidelines for Indoor Air Quality, Dampness and Mould Publications, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark [Internet]. **2009**.

(8) Reboux, G.; Roussel, S.; Grenouillet, F. Fungi in agricultural environment. *J. Mycol. Med.* **2006**, 16(4), 248-262.

(9) Gangneux, J.-P.; Bousseau, A.; Cornillet, A.; Kauffmann-Lacroix, C. Control of fungal environmental risk in French hospitals. *J. Mycol. Med.* **2006**, 16(4), 204-211.

(10) Fischer, G.; Dott, W. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Arch. Microbiol.* **2003**, 179(2), 75-82.

(11) McGinnis, M. R. Pathogenesis of indoor fungal diseases. *Med. Mycol.* **2004**, 42(2), 107.

(12) Sherif, R.; Segal, B. H. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2010**, 16(3), 242-250.

(13) Thornton, C. R. Detection of invasive aspergillosis. *Adv. Appl. Microbiol.* **2010**, 70, 187-216.

(14) Burge, H. A. Fungi: toxic killers or unavoidable nuisances? *Ann. Allerg. Asthma Im.* **2001**, 87(6), 52-56.

(15) Mendell, M. J.; Mirer, A. G.; Cheung, K.; Tong, M.; Douwes, J. Respiratory and Allergic Health Effects of Dampness, Mold, and Dampness-Related Agents: A Review of the Epidemiologic Evidence. *Environ. Health Persp.* **2011**, In Press, DOI 10.1289/ehp.1002410.

- (16) Fog Nielsen, K. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet. Biol.* **2003**, 39(2), 103-117.
- (17) Jarvis, B. B.; Miller, J. D. Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Appl. Microbiol. Biot.* **2005**, 66(4), 367-372.
- (18) Douwes, J. (1→3)-beta-D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence. *Indoor Air* **2005**, 15(3), 160-169.
- (19) Wålinder, R.; Ernstgård, L.; Johanson, G.; Norbäck, D.; Venge, P.; Wieslander, G. Acute Effects of a Fungal Volatile Compound. *Environ. Health Perspect.* **2005**, 113(12), 1775-1778.
- (20) Garcia-Vidal, C.; Upton, A.; Kirby, K. A.; Marr, K. A. Epidemiology of Invasive Mold Infections in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Biological Risk Factors for Infection According to Time after Transplantation. *Clin Infect Dis.* **2008**, 47(8), 1041-1050.
- (21) Perfect, J. R.; Cox, G. M.; Lee, J. Y.; Kauffman, C. A.; de Repentigny, L.; Chapman, S. W.; Morrison, V. A.; Pappas, P.; Hiemenz, J. W.; Stevens, D. A. The Impact of Culture Isolation of *Aspergillus* Species: A Hospital-Based Survey of Aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, 33(11), 1824-1833.
- (22) Fleming, R. V.; Walsh, T. J.; Anaissie, E. J. Emerging and less common fungal pathogens. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2002**, 16(4), 915-933.
- (23) Lanternier, F.; Sun, H.-Y.; Ribaud, P.; Singh, N.; Kontoyiannis, D. P.; Lortholary, O. Mucormycosis in Organ and Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis.* **2012**, 54(11), 1-8.
- (24) Peláez, T.; Muñoz, P.; Guinea, J.; Valerio, M.; Giannella, M.; Klaassen, C. H. W.; Bouza, E. Outbreak of Invasive Aspergillosis After Major Heart Surgery Caused by Spores in the Air of the Intensive Care Unit. *Clin Infect Dis.* **2012**, 54(3), e24-e31.
- (25) Anaissie, E. J.; Stratton, S. L.; Dignani, M. C.; Lee, C.; Mahfouz, T. H.; Rex, J. H.; Summerbell, R. C.; Walsh, T. J. Cleaning Patient Shower Facilities: A Novel Approach to Reducing Patient Exposure to Aerosolized *Aspergillus* Species and Other Opportunistic Molds. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, 35(8), e86-e88.
- (26) Warris, A.; Verweij, P. E. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. *Med Mycol* **2005**, 43 Suppl 1, S59-S65.
- (27) Lortholary, O.; Gangneux, J.-P.; Sitbon, K.; Lebeau, B.; de Monbrison, F.; Le Strat, Y.; Coignard, B.; Dromer, F.; Bretagne, S.; Group, for the F. M. S. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005–2007). *Clin Microbiol Infect* **2011**, 17(12), 1882–1889.
- (28) Faure, O.; Fricker-Hidalgo, H.; Lebeau, B.; Mallaret, M. R.; Ambroise-Thomas, P.; Grillot, R. Eight-year surveillance of environmental fungal contamination in hospital operating rooms and haematological units. *J. Hosp. Infect.* **2002**, 50(2), 155-160.
- (29) Araujo, R.; Cabral, J. P.; Rodrigues, A. G. Air filtration systems and restrictive access conditions improve indoor air quality in clinical units: *Penicillium* as a general indicator of hospital indoor fungal levels. *Am. J. Infect. Control* **2008**, 36(2), 129-134.
- (30) Morrison, J.; Yang, C.; Lin, K.-T.; Haugland, R. A.; Neely, A. N.; Vesper, S. J. Monitoring *Aspergillus* species by quantitative PCR during construction of a multi-storey hospital building. *J. Hosp. Infect.* **2004**, 57(1), 85-87.
- (31) Chang, C. C.; Cheng, A. C.; Devitt, B.; Hughes, A. J.; Campbell, P.; Styles, K.; Low, J.; Athan, E. Successful control of an outbreak of invasive aspergillosis in a regional haematology unit during hospital construction works. *J. Hosp. Infect.* **2008**, 69(1), 33-38.
- (32) Alberti, C.; Bouakline, A.; Ribaud, P.; Lacroix, C.; Rousselot, P.; Leblanc, T.; Derouin, F. Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. *J. Hosp. Infect.* **2001**, 48(3), 198-206.
- (33) Fournel, I.; Sautour, M.; Lafon, I.; Sixt, N.; L'Ollivier, C.; Dalle, F.; Chavanet, P.; Couillaud, G.; Caillot, D.; Astruc, K.; Bonnin, A.; Aho-Glélé, L.-S. Airborne *Aspergillus* contamination during hospital construction works: Efficacy of protective measures. *Am. J. Infect. Control* **2010**, 38(3), 189-194.
- (34) Gangneux, J.-P.; Adjidé, C.-C.; Bernard, L.; Botterel, F.; Carel, A.; Castel, O.; Derouin, F.; Hoarau, G.; Labussière, H.; Lafaurie, M.; Millon, L.; Pottecher, B.; Thiebaut, A.; Turco, M.; Baron, R. Quantitative assessment of fungal risk in the case of construction works in healthcare establishments: Proposed indicators for the determination of the impact of management precautions on the risk of fungal infection. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* **2012**, 22(1), 64-71.
- (35) Portnoy, J. M.; Barnes, C. S.; Kennedy, K. Sampling for indoor fungi. *J. Allergy Clin. Immun.* **2004**, 113(2), 189-198.
- (36) Fisk, W. J.; Lei-Gomez, Q.; Mendell, M. J. Meta-analyses of the associations of respiratory health effects with dampness and mold in homes. *Indoor Air* **2007**, 17(4), 284-296.
- (37) Reponen, T.; Vesper, S.; Levin, L.; Johansson, E.; Ryan, P.; Burkle, J.; Grinspun, S. A.; Zheng, S.; Bernstein, D. I.; Lockey, J.; Villareal, M.; Khurana Hershey, G. K.; LeMasters, G. High environmental relative moldiness index during infancy as a predictor of asthma at 7 years of age. *Ann. Allerg. Asthma Im.* **2011**, 107(2), 120-126.
- (38) Allermann, L.; Wilkins, C. K.; Madsen, A. M. Inflammatory potency of dust from the indoor environment and correlation to content of NAGase and fungi. *Toxicol. In Vitro* **2006**, 20(8), 1522-1531.
- (39) Takigawa, T.; Wang, B.-L.; Sakano, N.; Wang, D.-H.; Ogino, K.; Kishi, R. A longitudinal study of environmental risk factors for subjective symptoms

associated with sick building syndrome in new dwellings. *Sci. Total Environ.* **2009**, 407(19), 5223-5228.

(40) Burr, M. L. Health effects of indoor molds. *Rev. Environ. Health* **2001**, 16(2), 97-103.

(41) Ren, P.; Jankun, T. M.; Belanger, K.; Bracken, M. B.; Leaderer, B. P. The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics. *Allergy* **2001**, 56(5), 419-424.

(42) Karvala, K.; Toskala, E.; Luukkonen, R.; Uitti, J.; Lappalainen, S.; Nordman, H. Prolonged exposure to damp and moldy workplaces and new-onset asthma. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **2011**, 84, 713-721.

(43) Danuser, B.; Weber, C.; Künzli, N.; Schindler, C.; Nowak, D. Respiratory symptoms in Swiss farmers: An epidemiological study of risk factors. *Am. J. Ind. Med.* **2001**, 39(4), 410-418.

(44) Radon, K.; Danuser, B.; Iversen, M.; Monso, E.; Weber, C.; Hartung, J.; Donham, K.; Palmgren, U.; Nowak, D. Air contaminants in different European farming environments. *Ann. Agr. Env. Med.* **2002**, 9(1), 41-48.

(45) Adhikari, A.; Sen, M. M.; Gupta-Bhattacharya, S.; Chanda, S. Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. *Environ. Int.* **2004**, 29(8), 1071-1078.

(46) Omland, O. Exposure and respiratory health in farming in temperate zones-a review of the literature. *Ann. Agr. Env. Med.* **2002**, 9(2), 119-136.

(47) Cormier, Y.; Israel-Assayag, E.; Racine, G.; Duchaine, C. Farming practices and the respiratory health risks of swine confinement buildings. *Eur. Respir. J.* **2000**, 15(3), 560-565.

(48) Reboux, G.; Piarroux, R.; Mauny, F.; Madroszyk, A.; Millon, L.; Bardonnet, K.; Dalphin, J.-C. Role of Molds in Farmer's Lung Disease in Eastern France. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, 163(7), 1534-1539.

(49) Karvala, K.; Nordman, H.; Luukkonen, R.; Nykyri, E.; Lappalainen, S.; Hannu, T.; Toskala, E. Occupational rhinitis in damp and moldy workplaces. *Am. J. Rhinol.* **2008**, 22(5), 457-462.

(50) Bünger, J.; Schappler-Scheele, B.; Hilgers, R.; Hallier, E. A 5-year follow-up study on respiratory disorders and lung function in workers exposed to organic dust from composting plants. *Int. Arch. Occ. Env. Hea.* **2007**, 80(4), 306-312.

(51) O'Gorman, C. Airborne *Aspergillus fumigatus* conidia: a risk factor for aspergillosis. *Fungal Biol. Rev.* **2011**, 25(3), 151-157.

(52) Zeng, Q.-Y.; Westermarck, S.-O.; Rasmuson-Lestander, A.; Wang, X.-R. Detection and Quantification of *Wallemia sebi* in Aerosols by Real-Time PCR, Conventional PCR, and Cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70(12), 7295-7302.

(53) Eduard, W. Fungal spores: A critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Critical Reviews in Toxicology* **2009**, 39(10), 799-864.

(54) Roussel, S.; Reboux, G.; Millon, L.; Dalphin, J.-C.; Piarroux, R. Hypersensitivity pneumonitis and exposure to moulds and actinomycetes in the environment. *J. Mycol. Med.* **2006**, 16(4), 239-247.

(55) Gangneux, J.-P.; Bretagne, S.; Cordonnier, C.; Datry, A.; Derouin, F.; Grillot, R.; Kauffmann-Lacroix, C.; Lebeau, B.; Morin, O.; Nicolle, M.-C.; Piens, M.-A.; Poirot, J.-L. Prevention of nosocomial fungal infection: The French approach. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, 35(3), 343-346.

(56) Jovanovic, S.; Felder-Kennel, A.; Gabrio, T.; Kouros, B.; Link, B.; Maisner, V.; Piechotowski, I.; Schick, K.-H.; Schrimpf, M.; Weidner, U.; Zöllner, I.; Schwenk, M. Indoor fungi levels in homes of children with and without allergy history. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* **2004**, 207(4), 369-378.

(57) Reboux, G.; Bellanger, A. P.; Roussel, S.; Grenouillet, F.; Sornin, S.; Piarroux, R.; Dalphin, J. C.; Millon, L. Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor Air* **2009**, 19(6), 446-453.

(58) Godish, D. R.; Godish, T. J. Relationship between sampling duration and concentration of culturable airborne mould and bacteria on selected culture media. *Journal of Applied Microbiology* **2007**, 102(6), 1479-1484.

(59) Yao, M.; Mainelis, G. Use of portable microbial samplers for estimating inhalation exposure to viable biological agents. *J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol.* **2007**, 17(1), 31-38.

(60) Gangneux, J.; Robert-Gangneux, F.; Gicquel, G.; Tanquerel, J.; Chevrier, S.; Poisson, M.; Aupée, M.; Guiguen, C. Bacterial and fungal counts in hospital air: Comparative yields for 4 sieve impactor air samplers with 2 culture media. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2006**, 27(12), 1405-1408.

(61) An, H. R.; Mainelis, G.; Yao, M. Evaluation of a high-volume portable bioaerosol sampler in laboratory and field environments. *Indoor Air* **2004**, 14(6), 385-393.

(62) Haatainen, S.; Laitinen, J.; Linnainmaa, M.; Reponen, T.; Kalliokoski, P. The Suitability of the IOM - Foam Sampler for Bioaerosol Sampling in Occupational Environments. *J. Occup. Environ. Hyg.* **2010**, 7(1), 1.

(63) Boutin-Forzano, S.; Charpin-Kadouch, C.; Chabbi, S.; Bennedjai, N.; Dumon, H.; Charpin, D. Wall relative humidity: a simple and reliable index for predicting *Stachybotrys chartarum* infestation in dwellings. *Indoor Air* **2004**, 14(3), 196-199.

(64) Barnes, C. S.; Amado, M.; Portnoy, J. M. Reduced clinic, emergency room, and hospital utilization after home environmental assessment and case management. *Allergy Asthma Proc.* **2010**, 31(4), 317-323.

(65) Cai, G. -H; Bröms, K.; Mälarstig, B.; Zhao, Z. -H; Kim, J. L.; Svärdsudd, K.; Janson, C.; Norbäck, D.

Quantitative PCR analysis of fungal DNA in Swedish day care centers and comparison with building characteristics and allergen levels. *Indoor Air* **2009**, 19(5), 392-400.

- (66) Sixt, N.; Dalle, F.; Lafon, I.; Aho, S.; Couillault, G.; Valot, S.; Calinon, C.; Danaire, V.; Vagner, O.; Cuisenier, B.; Sautour, M.; Besancenot, J. P.; L'Ollivier, C.; Caillot, D.; Bonnin, A. Reduced fungal contamination of the indoor environment with the Plasmair(TM) system (Airspace). *J. Hosp. Infect.* **2007**, 65(2), 156-162.
- (67) Macher, J. M. Evaluation of a Procedure to Isolate Culturable Microorganisms from Carpet Dust. *Indoor Air* **2001**, 11(2), 134-140.
- (68) Noss, I.; Wouters, I. M.; Visser, M.; Heederik, D. J. J.; Thorne, P. S.; Brunekreef, B.; Doekes, G. Evaluation of a Low-Cost Electrostatic Dust Fall Collector for Indoor Air Endotoxin Exposure Assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74(18), 5621-5627.
- (69) Normand, A.-C.; Vacheyrou, M.; Sudre, B.; Heederik, D. J. J.; Piarroux, R. Assessment of Dust Sampling Methods for the Study of Cultivable-Microorganism Exposure in Stables. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75(24), 7617-7623.
- (70) Frankel, M.; Timm, M.; Hansen, E. W.; Madsen, A. M. Comparison of sampling methods for the assessment of indoor microbial exposure [Internet]. *Indoor Air* **2012**,
- (71) Godish, D.; Godish, T. Total Airborne Mold Particle Sampling: Evaluation of Sample Collection, Preparation and Counting Procedures, and Collection Devices. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* **2007**, 5(2), 100-106.
- (72) Fabian, M. P.; Miller, S. L.; Reponen, T.; Hernandez, M. T. Ambient bioaerosol indices for indoor air quality assessments of flood reclamation. *J. Aerosol Sci.* **2005**, 36(5-6), 763-783.
- (73) Adhikari, A.; Reponen, T.; Lee, S.-A.; Grinshpun, S. A. Assessment of human exposure to airborne fungi in agricultural confinements: personal inhalable sampling versus stationary sampling. *Ann. Agr. Env. Med.* **2004**, 11(2), 269-277.
- (74) Fairs, A.; Wardlaw, A. J.; Thompson; Pashley, C. H. Guidelines on ambient intramural airborne fungal spores. *J. Invest. Allerg. Clin.* **2010**, 20(6), 490-498.
- (75) Wu, P.-C.; Su, H.-J. J.; Ho, H.-M. A Comparison of Sampling Media for Environmental Viable Fungi Collected in a Hospital Environment. *Environ. Res.* **2000**, 82(3), 253-257.
- (76) Chao, H.; Milton, D.; Schwartz, J.; Burge, H. Dustborne fungi in large office buildings. *Mycopathologia* **2002**, 154(2), 93-106.
- (77) Meklin, T.; Haugland, R. A.; Reponen, T.; Varma, M.; Lummus, Z.; Bernstein, D.; Wymer, L. J.; Vesper, S. J. Quantitative PCR analysis of house dust can reveal abnormal mold conditions. *J. Environ. Monitor.* **2004**, 6(7), 615.
- (78) Yamamoto, N.; Kimura, M.; Matsuki, H.; Yanagisawa, Y. Optimization of a real-time PCR assay to quantitate airborne fungi collected on a gelatin filter. *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, 109(1), 83-88.
- (79) Peccia, J.; Hernandez, M. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review. *Atmos. Environ.* **2006**, 40(21), 3941-3961.
- (80) Stetzenbach, L. D.; Buttner, M. P.; Cruz, P. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Curr. Opin. Biotech.* **2004**, 15(3), 170-174.
- (81) Goebes, M. D.; Hildemann, L. M.; Kujundzic, E.; Hernandez, M. Real-time PCR for detection of the *Aspergillus* genus. *J. Environ. Monitor.* **2007**, 9(6), 599-609.
- (82) Vesper, S. Traditional mould analysis compared to a DNA-based method of mould analysis. *Crit. Rev. Microbiol.* **2011**, 37(1), 15-24.
- (83) Vesper, S.; McKinstry, C.; Haugland, R.; Wymer, L.; Bradham, K.; Ashley, P.; Cox, D.; Dewalt, G.; Friedman, W. Development of an Environmental Relative Moldiness Index for US Homes. *J. Occup. Environ. Med.* **2007**, 49(8), 829-833.
- (84) Vesper, S.; McKinstry, C.; Haugland, R.; Neas, L.; Hudgens, E.; Heidenfelder, B.; Gallagher, J. Higher Environmental Relative Moldiness Index (ERMIsm) values measured in Detroit homes of severely asthmatic children. *Sci. Total Environ.* **2008**, 394(1), 192-196.
- (85) Bellanger, A.-P.; Reboux, G.; Murat, J.-B.; Bex, V.; Millon, L. Detection of *Aspergillus fumigatus* by quantitative polymerase chain reaction in air samples impacted on low-melt agar. *Am. J. Infect. Control* **2010**, 38(3), 195-198.
- (86) Neely, A. N.; Gallardo, V.; Barth, E.; Richard A. Haugland, P.; Warden, G. D.; Vesper, S. J. Rapid monitoring by quantitative polymerase chain reaction for pathogenic *Aspergillus* during carpet removal from a hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2004**, 25(4), 350-352.
- (87) Pitkaranta, M.; Meklin, T.; Hyvarinen, A.; Paulin, L.; Auvinen, P.; Nevalainen, A.; Rintala, H. Analysis of Fungal Flora in Indoor Dust by Ribosomal DNA Sequence Analysis, Quantitative PCR, and Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74(1), 233-244.
- (88) Bellanger, A.-P.; Reboux, G.; Roussel, S.; Grenouillet, F.; Didier-Scherer, E.; Dalphin, J.-C.; Millon, L. Indoor fungal contamination of moisture-damaged and allergic patient housing analysed using real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **2009**, 49(2), 260-266.
- (89) Meklin, T.; Reponen, T.; McKinstry, C.; Cho, S.-H.; Grinshpun, S. A.; Nevalainen, A.; Vepsäläinen, A.; Haugland, R. A.; LeMasters, G.; Vesper, S. J. Comparison of mold concentrations quantified by MSQPCR in indoor and outdoor air sampled simultaneously. *Sci. Total Environ.* **2007**, 382(1), 130-134.

- (90) Lignell, U.; Meklin, T.; Rintala, H.; Hyvärinen, A.; Vepsäläinen, A.; Pekkanen, J.; Nevalainen, A. Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomycetes in relation to moisture damage of the house. *Lett. Appl. Microbiol.* **2008**, 47(4), 303-308.
- (91) Yap, J.; Toh, Z. A.; Goh, V.; Ng, L. C.; Vesper, S. Assessment of mold concentrations in Singapore shopping centers using mold-specific quantitative PCR (MSQPCR) analysis. *Indian J. Microbiol.* **2009**, 49(3), 290-293.
- (92) Zeng, Q.-Y.; Westermarck, S.-O.; Rasmuson-Lestander, Å.; Wang, X.-R. Detection and quantification of *Cladosporium* in aerosols by real-time PCR. *J. Environ. Monitor.* **2006**, 8(1), 153.
- (93) Norbäck, D.; Cai, G.-H. Fungal DNA in hotel rooms in Europe and Asia—associations with latitude, precipitation, building data, room characteristics and hotel ranking. *Journal of Environmental Monitoring* **2011**, 13, 2895.
- (94) Prigione, V.; Lingua, G.; Marchisio, V. F. Development and use of flow cytometry for detection of airborne fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70(3), 1360-1365.
- (95) Vanhee, L. M.; Nelis, H. J.; Coenye, T. Detection and quantification of viable airborne bacteria and fungi using solid-phase cytometry. *Nat. Protoc.* **2009**, 4(2), 224.
- (96) Vanhee, L. M. E.; Nelis, H. J.; Coenye, T. Rapid detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* in environmental air samples using solid-phase cytometry. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43(9), 3233-3239.
- (97) Robine, E.; Lacaze, I.; Moularat, S.; Ritoux, S.; Boissier, M. Characterisation of exposure to airborne fungi: Measurement of ergosterol. *J. Microbiol. Meth.* **2005**, 63(2), 185-192.
- (98) Dales, R.; Ruest, K.; Guay, M.; Marro, L.; David Miller, J. Residential fungal growth and incidence of acute respiratory illness during the first two years of life. *Environ. Res.* **2010**, 110(7), 692-698.
- (99) Park, J.-H.; Cox-Ganser, J. M.; Kreiss, K.; White, S. K.; Rao, C. Y. Hydrophilic Fungi and Ergosterol Associated with Respiratory Illness in a Water-Damaged Building. *Environ. Health Persp.* **2007**, 116(1), 45-50.
- (100) Crawford, C.; Reponen, T.; Lee, T.; Iossifova, Y.; Levin, L.; Adhikari, A.; Grinshpun, S. A. Temporal and spatial variation of indoor and outdoor airborne fungal spores, pollen, and (1→3)-β-D-glucan. *Aerobiologia* **2009**, 25(3), 147-158.
- (101) Bex, V.; Squinazi, F. Indoor moulds detection by the measurement of (1→3)-β-D-glucanes. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* **2006**, 46(3), 184-187.
- (102) Foto, M.; Vrijmoed, L. L. P.; Miller, J. D.; Ruest, K.; Lawton, M.; Dales, R. E. A comparison of airborne ergosterol, glucan and Air-O-Cell data in relation to physical assessments of mold damage and some other parameters. *Indoor Air* **2005**, 15(4), 257-266.
- (103) Foto, M.; Plett, J.; Berghout, J.; Miller, J. D. Modification of the *Limulus* amoebocyte lysate assay for the analysis of glucan in indoor environments. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 379(1), 156-162.
- (104) Seo, S.-C.; Grinshpun, S. A.; Iossifova, Y.; Schmechel, D.; Rao, C. Y.; Reponen, T. A New Field-Compatible Methodology for the Collection and Analysis of Fungal Fragments. *Aerosol Sci. Tech.* **2007**, 41(8), 794.
- (105) Chen, Q.; Hildemann, L. M. The Effects of Human Activities on Exposure to Particulate Matter and Bioaerosols in Residential Homes. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43(13), 4641-4646.
- (106) Codispoti, C. D.; Levin, L.; LeMasters, G. K.; Ryan, P.; Reponen, T.; Villareal, M.; Burkle, J.; Stanforth, S.; Lockey, J. E.; Khurana Hershey, G. K.; Bernstein, D. I. Breast-feeding, aeroallergen sensitization, and environmental exposures during infancy are determinants of childhood allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immun.* **2010**, 125(5), 1054-1060.
- (107) Adhikari, A.; Gupta, J.; Wilkins, J. R.; Olds, R. L.; Indugula, R.; Cho, K. J.; Li, C.; Yermakov, M. Airborne Microorganisms, Endotoxin, and (1→3)-B-D-Glucan Exposure in Greenhouses and Assessment of Respiratory Symptoms Among Workers. *Ann Occup Hyg* **2011**, 55(3), 272-285.
- (108) Hansen, V. M.; Meyling, N. V.; Winding, A.; Eilenberg, J.; Madsen, A. M. Factors Affecting Vegetable Growers' Exposure to Fungal Bioaerosols and Airborne Dust. *Ann Occup Hyg* **2012**, 56(2), 170-181.
- (109) Van Lancker, F.; Adams, A.; Delmulle, B.; De Saeger, S.; Moretti, A.; Van Peteghem, C.; De Kimpe, N. Use of headspace SPME-GC-MS for the analysis of the volatiles produced by indoor molds grown on different substrates. *Journal of Environmental Monitoring* **2008**, 10, 1127.
- (110) Joblin, Y.; Moularat, S.; Anton, R.; Bousta, F.; Oriol, G.; Robine, E.; Picon, O.; Bourouina, T. Detection of moulds by volatile organic compounds: Application to heritage conservation. *Int. Biodeter. Biodegr.* **2010**, 64(3), 210-217.
- (111) Reboux, G.; Bellanger, A.-P.; Dalphin, J.-C. Contre: les composés organiques volatils d'origine fongique ont un impact sur la santé. *Revue Française d'Allergologie* **2011**, 51(3), 350-353.
- (112) Moularat, S.; Robine, E.; Ramalho, O.; Oturan, M. A. Detection of fungal development in closed spaces through the determination of specific chemical targets. *Chemosphere* **2008**, 72(2), 224-232.
- (113) Schuchardt, S.; Kruse, H. Quantitative volatile metabolite profiling of common indoor fungi: relevancy for indoor air analysis. *J. Basic Microb.* **2009**, 49(4), 350-362.
- (114) Schleibinger, H.; Laussmann, D.; Bornehag, C.-G.; Eis, D.; Rueden, H. Microbial volatile organic compounds in the air of moldy and mold-free indoor environments. *Indoor Air* **2008**, 18(2), 113-124.

- (115) Polizzi, V.; Delmulle, B.; Adams, A.; Moretti, A.; Susca, A.; Picco, A. M.; Rosseel, Y.; Kindt, R.; Van Bocxlaer, J.; De Kimpe, N.; Van Peteghem, C.; De Saeger, S. JEM Spotlight: Fungi, mycotoxins and microbial volatile organic compounds in mouldy interiors from water-damaged buildings. *J. Environ. Monitor.* **2009**, 11, 1849.
- (116) Claeson, A.-S.; Sandström, M.; Sunesson, A.-L. Volatile organic compounds (VOCs) emitted from materials collected from buildings affected by microorganisms. *J. Environ. Monitor.* **2007**, 9(3), 240.
- (117) Hulin, M.; Moularat, S.; Kirchner, S.; Robine, E.; Mandin, C.; Annesi-Maesano, I. Positive associations between respiratory outcomes and fungal index in rural inhabitants of a representative sample of French dwellings. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **2012**.
- (118) Reboux, G. Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* **2006**, 46(3), 208-212.
- (119) Lanier, C.; Richard, E.; Heutte, N.; Picquet, R.; Bouchart, V.; Garon, D. Airborne molds and mycotoxins associated with handling of corn silage and oilseed cakes in agricultural environment. *Atmospheric Environment* **2010**, 44(16), 1980-1986.
- (120) Richard, E.; Heutte, N.; Sage, L.; Pottier, D.; Bouchart, V.; Lebailly, P.; Garon, D. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology* **2007**, 45(12), 2420-2425.
- (121) Kuhn, D. M.; Ghannoum, M. A. Indoor Mold, Toxigenic Fungi, and *Stachybotrys chartarum*: Infectious Disease Perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, 16(1), 144-172.
- (122) Tuomi, T.; Reijula, K.; Johnsson, T.; Hemminki, K.; Hintikka, E.-L.; Lindroos, O.; Kalso, S.; Koukila-Kahkola, P.; Mussalo-Rauhamaa, H.; Haahtela, T. Mycotoxins in Crude Building Materials from Water-Damaged Buildings. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66(5), 1899-1904.
- (123) Bloom, E.; Nyman, E.; Must, A.; Pehrson, C.; Larsson, L. Molds and Mycotoxins in Indoor Environments — A Survey in Water-Damaged Buildings. *J. Occup. Environ. Hyg.* **2009**, 6(11), 671-678.
- (124) Brasel, T. L.; Martin, J. M.; Carriker, C. G.; Wilson, S. C.; Straus, D. C. Detection of Airborne *Stachybotrys chartarum* Macrocytic Trichothecene Mycotoxins in the Indoor Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71(11), 7376-7388.
- (125) Charpin-Kadouch, C.; Maurel, G.; Felipo, R.; Queralt, J.; Ramadour, M.; Dumon, H.; Garans, M.; Botta, A.; Charpin, D. Mycotoxin identification in moldy dwellings. *J. Appl. Toxicol.* **2006**, 26(6), 475-479.
- (126) Tovey, E. R.; Taylor, D. J. M.; Graham, A. H.; O'Meara, T. J.; Lovborg, U.; Jones, A.; Sporik, R. New immunodiagnostic system. *Aerobiologia* **2000**, 16(1), 113-118.
- (127) Green, B. J.; Tovey, E. R.; Beezhold, D. H.; Perzanowski, M. S.; Acosta, L. M.; Divjan, A. I.; Chew, G. L. Surveillance of fungal allergic sensitization using the fluorescent halogen immunoassay. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* **2009**, 19(4), 253-261.
- (128) Trout, D. B.; Seltzer, J. M.; Page, E. H.; Biagini, R. E.; Schmechel, D.; Lewis, D. M.; Boudreau, A. Y. Clinical use of immunoassays in assessing exposure to fungi and potential health effects related to fungal exposure. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **2004**, 92(5), 483-492.
- (129) Schmechel, D.; Simpson, J. P.; Lewis, D. M. The production and characterization of monoclonal antibodies to the fungus *Aspergillus versicolor*. *Indoor Air* **2005**, 15, 11-19.
- (130) Schmechel, D.; Górný, R. L.; Simpson, J. P.; Reponen, T.; Grinshpun, S. A.; Lewis, D. M. Limitations of monoclonal antibodies for monitoring of fungal aerosols using *Penicillium brevicompactum* as a model fungus. *Journal of Immunological Methods* **2003**, 283(1-2), 235-245.
- (131) Niemeier, R. T.; Sivasubramani, S. K.; Reponen, T.; Grinshpun, S. A. Assessment of Fungal Contamination in Moldy Homes: Comparison of Different Methods. *J. Occup. Environ. Hyg.* **2006**, 3(5), 262.
- (132) Vesper, S.; McKinstry, C.; Hartmann, C.; Neace, M.; Yoder, S.; Vesper, A. Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *J. Microbiol. Meth.* **2008**, 72(2), 180-184.
- (133) De Vos, M. M.; Nelis, H. J. An improved method for the selective detection of fungi in hospital waters by solid phase cytometry. *J. Microbiol. Meth.* **2006**, 67(3), 557-565.
- (134) Chew, G. L.; Rogers, C.; Burge, H. A.; Muilenberg, M. L.; Gold, D. R. Dustborne and airborne fungal propagules represent a different spectrum of fungi with differing relations to home characteristics. *Allergy* **2003**, 58(1), 13-20.
- (135) Gorný, R. L.; Reponen, T.; Willeke, K.; Schmechel, D.; Robine, E.; Boissier, M.; Grinshpun, S. A. Fungal Fragments as Indoor Air Biocontaminants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68(7), 3522-3531.
- (136) Kanaani, H.; Hargreaves, M.; Ristovski, Z.; Morawska, L. Deposition rates of fungal spores in indoor environments, factors effecting them and comparison with non-biological aerosols. *Atmos. Environ.* **2008**, 42(30), 7141-7154.
- (137) Cho, S.-H.; Seo, S.-C.; Schmechel, D.; Grinshpun, S. A.; Reponen, T. Aerodynamic characteristics and respiratory deposition of fungal fragments. *Atmos. Environ.* **2005**, 39(30), 5454-5465.
- (138) Reponen, T.; Seo, S.-C.; Grimsley, F.; Lee, T.; Crawford, C.; Grinshpun, S. A. Fungal fragments in moldy

houses: A field study in homes in New Orleans and Southern Ohio. *Atmos. Environ.* **2007**, 41(37), 8140-8149.

(139) Górny, R. L. Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air--a review. *Ann. Agr. Env. Med.* **2004**, 11(2), 185-197.

(140) Brasel, T. L.; Douglas, D. R.; Wilson, S. C.; Straus, D. C. Detection of Airborne *Stachybotrys chartarum* Macrocytic Trichothecene Mycotoxins on Particulates Smaller than *Conidia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71(1), 114-122.

(141) Green, B. J.; Tovey, E. R.; Sercombe, J. K.; Blachere, F. M.; Beezhold, D. H.; Schmechel, D. Airborne fungal fragments and allergenicity. *Med. Mycol.* **2006**, 44(s1), S245-S255.

(142) Peccia, J.; Hospodsky, D.; Bibby, K. New Directions: A revolution in DNA sequencing now allows for the meaningful integration of biology with aerosol science. *Atmospheric Environment* **2011**, 45, 1896-1897.

(143) Metzker, M. L. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics* **2010**, 11(1), 31-46.

(144) Begerow, D.; Nilsson, H.; Unterseher, M.; Maier, W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, 87, 99-108.

(145) Tedersoo, L.; Nilsson, R. H.; Abarenkov, K.; Jairus, T.; Sadam, A.; Saar, I.; Bahram, M.; Bechem, E.; Chuyong, G.; Kõljalg, U. 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist* **2010**, 188(1), 291-301.

(146) Lee, J.-H.; Jo, W.-K. Characteristics of indoor and outdoor bioaerosols at Korean high-rise apartment buildings. *Environ. Res.* **2006**, 101(1), 11-17.

(147) O'Connor, G. T.; Walter, M.; Mitchell, H.; Kattan, M.; Morgan, W. J.; Gruchalla, R. S.; Pongracic, J. A.; Smartt, E.; Stout, J. W.; Evans III, R.; Crain, E. F.; Burge, H. A. Airborne fungi in the homes of children with asthma in low-income urban communities: The Inner-City Asthma Study. *J. Allergy Clin. Immun.* **2004**, 114(3), 599-606.

(148) Pongracic, J. A.; O'Connor, G. T.; Muilenberg, M. L.; Vaughn, B.; Gold, D. R.; Kattan, M.; Morgan, W. J.; Gruchalla, R. S.; Smartt, E.; Mitchell, H. E. Differential effects of outdoor versus indoor fungal spores on asthma morbidity in inner-city children. *J. Allergy Clin. Immun.* **2010**, 125(3), 593-599.

(149) Herbarth, O.; Schlink, U.; Müller, A.; Richter, M. Spatiotemporal distribution of airborne mould spores in apartments. *Mycol. Res.* **2003**, 107(11), 1361-1371.

(150) Lugauskas, A.; Krikstaponis, A.; Sveistyte, L. Airborne fungi in industrial environments--potential agents of respiratory diseases. *Ann. Agr. Env. Med.* **2004**, 11(1), 19-25.

(151) Duchaine, C.; Mériaux, A. Airborne microfungi from eastern Canadian sawmills. *Can. J. Microbiol.* **2000**, 46(7), 612-616.

(152) Chao, H. J.; Schwartz, J.; Milton, D. K.; Burge, H. A. Populations and Determinants of Airborne Fungi in Large Office Buildings. *Environ. Health Persp.* **2002**, 110(8), 777-782.

(153) Hyvärinen, A.; Vahteristo, M.; Meklin, T.; Jantunen, M.; Nevalainen, A.; Moschandreas, D. Temporal and Spatial Variation of Fungal Concentrations in Indoor Air. *Aerosol Sci. Tech.* **2001**, 35(2), 688.

(154) de Ana, S. G.; Torres-Rodríguez, J. M.; Ramírez, E. A.; García, S. M.; Belmonte-Soler, J. Seasonal distribution of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* species isolated in homes of fungal allergic patients. *J. Invest. Allerg. Clin.* **2006**, 16(6), 357-363.

(155) Roussel, S.; Reboux, G.; Bellanger, A.-P.; Sornin, S.; Grenouillet, F.; Dalphin, J.-C.; Piarroux, R.; Millon, L. Characteristics of dwellings contaminated by moulds. *J. Environ. Monitor.* **2008**, 10(6), 724-729.

(156) Dassonville, C.; Demattei, C.; Detaint, B.; Barral, S.; Bex-Capelle, V.; Momas, I. Assessment and predictors determination of indoor airborne fungal concentrations in Paris newborn babies' homes. *Environ. Res.* **2008**, 108(1), 80-85.

(157) Tolvanen, O. K.; Hänninen, K. I. Occupational hygiene in a waste incineration plant. *Waste Manage.* **2005**, 25(5), 519-529.

(158) Pastuszka, J. S.; Kyaw Tha Paw, U.; Lis, D. O.; Wlazlo, A.; Ulfig, K. Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland. *Atmos. Environ.* **2000**, 34(22), 3833-3842.

(159) Nesa, D.; Lortholary, J.; Bouakline, A.; Bordes, M.; Chandenier, J.; Derouin, F.; Gangneux, J.-P. Comparative performance of impactor air samplers for quantification of fungal contamination. *J. Hosp. Infect.* **2001**, 47(2), 149-155.

(160) Sautour, M.; Sixt, N.; Dalle, F.; L'Ollivier, C.; Fourquenot, V.; Calinon, C.; Paul, K.; Valvin, S.; Maurel, A.; Aho, S.; Couillault, G.; Cachia, C.; Vagner, O.; Cuisenier, B.; Caillot, D.; Bonnin, A. Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Sci. Total Environ.* **2009**, 407(12), 3766-3771.

(161) Falvey, D. G.; Streifel, A. J. Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. *J. Hosp. Infect.* **2007**, 67(1), 35-41.

(162) Awad, A. H. A. Airborne dust, bacteria, actinomycetes and fungi at a flourmill. *Aerobiologia* **2007**, 23(1), 59-69.

(163) Ko, G.; Simmons, I.; Likirdopulos, C. A.; Worley-Davis, L.; Williams, C. M.; Sobsey, M. D. Endotoxin Levels at Swine Farms Using Different Waste Treatment and Management Technologies. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44(9), 3442-3448.

- (164) Bellanger, A. P.; Reboux, G.; Scherer, E.; Vacheyrou, M.; Millon, L. Contribution of a Cyclonic-Based Liquid Air Collector for Detecting *Aspergillus fumigatus* by QPCR in Air Samples. *J Occup Environ Hyg* **2011**, 9(1), D7-D11.
- (165) Le Goff, O.; Bru-Adan, V.; Bacheley, H.; Godon, J.-J.; Wéry, N. The microbial signature of aerosols produced during the thermophilic phase of composting. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, 108(1), 325-340.
- (166) Skorska, C.; Sitkowska, J.; Kryszka-Traczyk, E.; Cholewa, G.; Dutkiewicz, J. Exposure to Airborne Microorganisms, Dust and Endotoxin During Processing of Peppermint and Chamomile Herbs on Farms. *Ann. Agr. Env. Med.* **2005**, 12(2), 281-288.
- (167) Wu, Z.; Blomquist, G.; Westermarck, S.-O.; Wang, X.-R. Application of PCR and probe hybridization techniques in detection of airborne fungal spores in environmental samples. *J. Environ. Monitor.* **2002**, 4(5), 673-678.
- (168) Duquenne, P.; Simon, X.; Koehler, V.; Goncalves-Machado, S.; Greff, G.; Nicot, T.; Poirot, P. Documentation of bioaerosol concentrations in an indoor composting facility in France. *J. Environ. Monit.* **2012**, 14(2), 409-419.
- (169) Niegutsila, A.; Arné, P.; Durand, B.; Deville, M.; Benoît-Valiergue, H.; Chermette, R.; Cottenot-Latouche, S.; Guillot, J. Relative efficiencies of two air sampling methods and three culture conditions for the assessment of airborne culturable fungi in a poultry farmhouse in France. *Environ. Res.* **2011**, 111(2), 248-253.
- (170) Koch, A.; Heilemann, K.-J.; Bischof, W.; Heinrich, J.; Wichmann, H. E. Indoor viable mold spores - a comparison between two cities, Erfurt (eastern Germany) and Hamburg (western Germany). *Allergy* **2000**, 55(2), 176-180.
- (171) Iossifova, Y.; Reponen, T.; Sucharew, H.; Succop, P.; Vesper, S. Use of (1-3)- β -d-glucan concentrations in dust as a surrogate method for estimating specific fungal exposures. *Indoor Air* **2008**, 18(3), 225-232.
- (172) Vesper, S. J.; McKinstry, C.; Haugland, R. A.; Iossifova, Y.; Lemasters, G.; Levin, L.; Khurana Hershey, G. K.; Villareal, M.; Bernstein, D. I.; Lockey, J.; Reponen, T. Relative moldiness index as predictor of childhood respiratory illness. *J. Expo. Sci. Env. Epid.* **2007**, 17(1), 88-94.
- (173) Rupp, M. E.; Iwen, P. C.; Tyner, L. K.; Marion, N.; Reed, E.; Anderson, J. R. Routine sampling of air for fungi does not predict risk of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J. Hosp. Infect.* **2008**, 68(3), 270-271.
- (174) Li, C.-S.; Hou, P.-A. Bioaerosol characteristics in hospital clean rooms. *Sci. Total Environ.* **2003**, 305(1-3), 169-176.
- (175) Aringoli, E. E.; Basílico, M. de la L. Z.; Altahus, R. L.; Basílico, J. C. Multivariate analysis of fungal associations in the indoor air of Argentinean houses. *Int. Biodeter. Biodegr.* **2008**, 62(3), 281-286.
- (176) Su, H.-J.; Wu, P.-C.; Chen, H.-L.; Lee, F.-C.; Lin, L.-L. Exposure Assessment of Indoor Allergens, Endotoxin, and Airborne Fungi for Homes in Southern Taiwan. *Environ. Res.* **2001**, 85(2), 135-144.
- (177) Niegutsila, A.; Goldenberg, O.; Deville, M.; Arné, P.; Benoît-Valiergue, H.; Chermette, R.; Latouche-Cottenot, S.; Pissard, S.; Guillot, J. Molecular monitoring of fungal communities in air samples by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC). *J. Appl. Microbiol.* **2010**, 109(3), 910-917.
- (178) Kryszka-Traczyk, E.; Pande, B. N.; Skórska, C.; Sitkowska, J.; Prazmo, Z.; Cholewa, G.; Dutkiewicz, J. Exposure of Indian agricultural workers to airborne microorganisms, dust and endotoxin during handling of various plant products. *Ann. Agr. Env. Med.* **2005**, 12(2), 269-275.
- (179) Ko, G.; Simmons III, O. D.; Likirdopulos, C. A.; Worley-Davis, L.; Williams, M.; Sobsey, M. D. Investigation of Bioaerosols Released from Swine Farms using Conventional and Alternative Waste Treatment and Management Technologies. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42(23), 8849-8857.
- (180) Normand, A.-C.; Sudre, B.; Vacheyrou, M.; Depner, M.; Wouters, I. M.; Noss, I.; Heederik, D.; Hyvärinen, A.; Genuneit, J.; Braun-Fahrlander, C.; Mutius, E. von; Piarroux, R. Airborne cultivable microflora and microbial transfer in farm buildings and rural dwellings. *Occup Environ Med* **2011**, 68(11), 849-855.

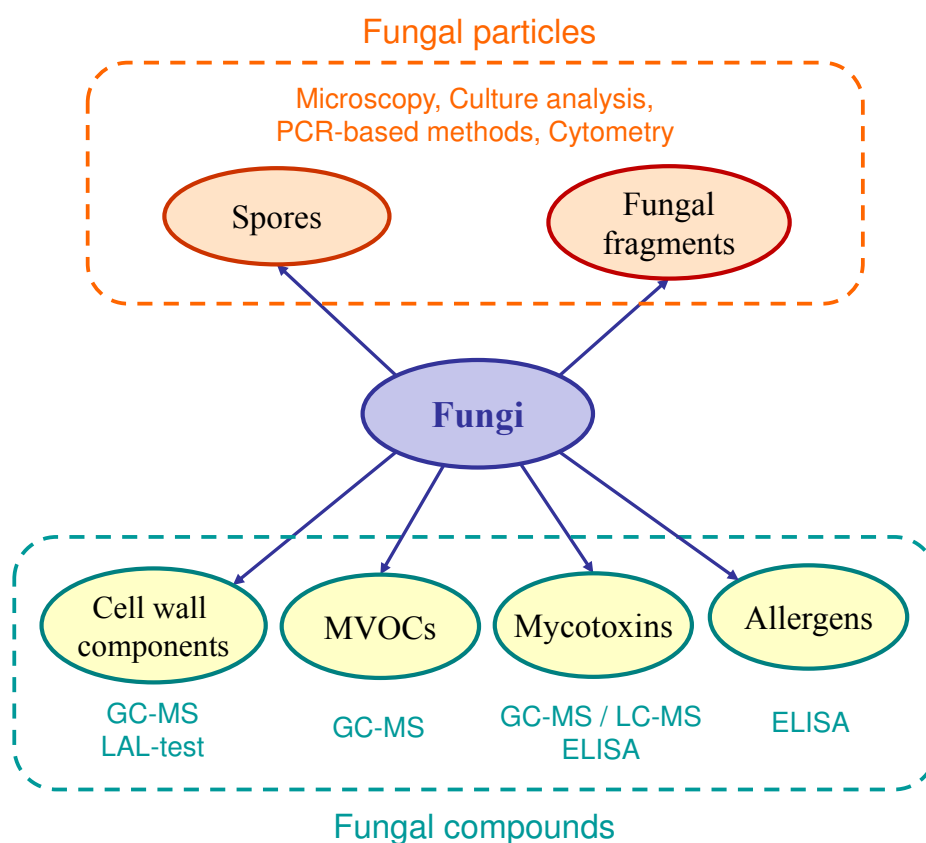


Figure 1. Analytical methods to detect fungi in indoor environments. MVOCs: Microbial Volatile Organic Compounds; GC-MS: Gas Chromatography / Mass Spectrometry; LC-MS: Liquid Chromatography / Mass Spectrometry; LAL test: Limulus Amebocyte Lysate test; ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Table 1. Air sampling techniques used in different indoor environments (hospitals, homes and workplaces)

Air Sampler	Volume range (L)	Hospital		Home		Workplace	
Impactor	< 100	28.3 Lpm 1min	(75)	20 Lpm 1min	(41)	25 Lpm 1-2min	(150)
				28.3 Lpm2min 30	(72; 146)	28.3 Lpm 0.5min	(151)
				Lpm 1min	(147)	28.3 Lpm 2min	(152)
				30.5 Lpm 1min	(148)	28.3 Lpm 3min	(45)
				45 Lpm 1min	(134)	100 Lpm <1min	(48)
				100 Lpm 1min	(56; 149)		
	100 to 300	28 Lpm 0.5-10min	(29)	28.3 Lpm 10min	(153)		
				90 Lpm 3.3min	(154)		
				100 Lpm 1min	(57; 155)	28.3 Lpm 0.5-5min	(157)
				100 Lpm 0.5+2min	(156)	28.3 Lpm 5-10min	(158)
				100 l	(39)		
> 300	100 Lpm 1-10min	(159)					
			100 Lpm 5min	(33; 66; 160)			
			1400 l	(161)			
Impinger	< 100				1 Lpm 15min	(150)	
	100 to 300				12.5 Lpm 15min	(162)	
	> 300			12.5 Lpm 3h	(72)	12.5 Lpm 30min	(163)
Centrifugal sampler	> 300	300 Lpm 5min	(164)	450 Lpm 10min	(124)	300 Lpm 30min	(165)
Filter collector	< 100					1 Lpm 15min C	(150)
						2 Lpm 30min GF	(166)
	100 to 300			3 Lpm 33min T	(88)	1.2 Lpm 1.5h P	(52)
						1-1.5 Lpm 2-4h P	(167)
						1.5 Lpm 1.7-2.5hP	(92)
						2 Lpm 1.4-2.7h P	(168)
						4 Lpm 1h MCE	(73)
	> 300	3 Lpm 3h P	(30)	2 Lpm 2-7days P	(98)		
				4 Lpm 24h MCE	(100)		
				4 Lpm 48h P	(89)	50 Lpm 10min G	(169)
			16.7 Lpm 2-3h P	(138)			

Lpm: litres per minute; C: cellulose membrane; G: gelatine membrane; GF: glass fibre filter; MCE: mixed cellulose ester filter; P: polycarbonate filter; T: teflon filter

Table 2. Dust sampling techniques used in different indoor environments (homes and workplaces)

Environment	Location	Area	Vacuuming rate	Type of filter	Analyses	Reference
Homes	carpet in the living room	1 m ²	2 min.m ⁻²	paper filter	culture	(170)
	floor surrounding the newborn's bed	2 m ²	2.5 min.m ⁻²	cellulose thimble	culture	(134)
	floor of the primary activity room of the child	2 m ² for carpets Entire area for hard floor	2 min.m ⁻²	Filter Queen Majestic vacuum cleaner	qPCR	(77)
	floor of the child's bedroom	1 m ²	2.5 min.m ⁻²	gelatin filter	culture	(56)
	floor of the infant's primary activity room	2 m ²	2 min.m ⁻²	Filter Queen Majestic vacuum cleaner	β-D-glucan	(106)
	baby's primary activity room floor	2 m ² for carpets Entire area for hard floor	2 min.m ⁻² 1 min.m ⁻²	custom-made cone-shape HEPA filter trap	β-D-glucan qPCR	(171; 172)
	floor in the living room and in the bedroom	2 m ² + 2 m ²	2.5 min.m ⁻²	the Mitest collector	qPCR	(83)
	patient's bedroom	9 ft ² for carpets 9 x 1ft ² for hard floor			allergen	(64)
Workplaces	floor in offices	2 m ²	2.5 min.m ⁻²	cellulose thimble	culture	(76)
	floor in offices of nursing home buildings				culture; qPCR; sequencing; ergosterol	(87)
	floor in day care centers			a Millipore filter (pore size 6 μm)	allergen	(65)

Table 3. Culture-based methods for fungal detection in indoor environments

Media	Hospital		Home		Workplace	
Sabouraud	27°C chl.	(28)				
	30°C chl.	(33; 66; 160)				
Sabouraud dextrose	25°C	(173)				
	30°C chl. gt.	(25)				
	30°C	(24)				
MEA					22°C	(92)
	30°C	(60)			25°C chl.	(177)
	37°C chl.	(32)	25°C chl.	(72; 156; 175)	28°C	(162)
	n.d.	(174)	25°C	(176)	30/22°C	(166; 178)
					RT	(179)
					RT chl.	(158)
DG18			25°C chl.	(170)		
	37/25°C	(29)	RT	(134; 147; 148)	22°C	(52)
			RT chl.	(149)	30°C chl.	(69)
			n.d.	(39)		
MEA/DG18			25°C	(41; 153)	20°C chl.	(48)
	25°C	(75)	28°C	(56)	25°C	(87)
	37/30°C	(85)	20/30°C	(57; 88)	25°C chl.	(169)
			25/30°C chl.	(155)	RT/30°C chl.	(180)
			RT chl.	(146)	RT	(76; 99)

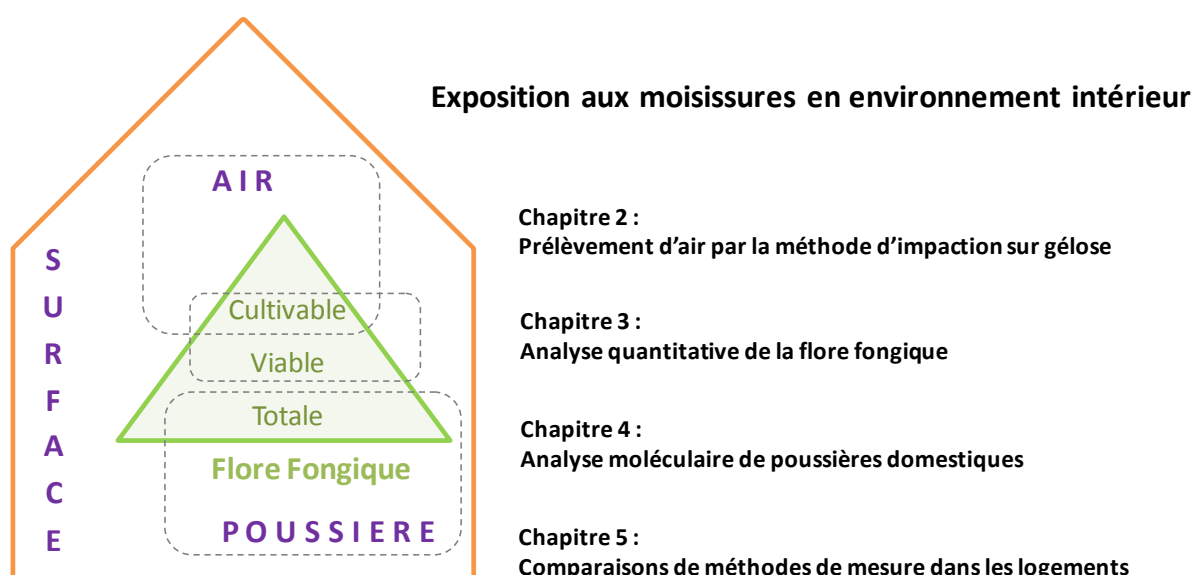
MEA: Malt Extract Agar; DG18: Dichloran Glycerol agar; RT: Room Temperature; n.d.: temperature not determined; chl.: chloramphenicol; gt.: gentamicin

Les objectifs

Le manque d'outils valides permettant d'évaluer quantitativement l'exposition fongique environnementale constitue une des principales difficultés pour mieux appréhender le rôle des particules et des composés fongiques sur la santé humaine. L'objet principal de ce travail de recherche a été d'évaluer des approches variées visant à mesurer l'exposition aux moisissures dans les environnements intérieurs, en étudiant à la fois des outils d'échantillonnage et des méthodes d'analyses.

Les travaux entrepris au cours de cette thèse ont été menés avec diverses approches, ayant pour objectifs :

- de tester en conditions réelles des systèmes de collecte de micro-organismes à différents niveaux de contamination de l'air intérieur (Chapitre 2),
- de comparer l'approche culturale traditionnelle à une technique plus récente de cytométrie pour quantifier la flore fongique dans des échantillons environnementaux (Chapitre 3),
- d'évaluer un outil moléculaire pour l'étude de la contamination fongique des logements (Chapitre 4),
- de comparer différentes méthodes de mesure de l'exposition fongique dans l'environnement domiciliaire (Chapitre 5).



Résultats

Les travaux de thèse ont donné lieu à la rédaction de plusieurs articles :

Article 1 : Indoor fungal contamination: health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces. *En préparation*

Article 2 : Comparative evaluation of three impactor samplers for measuring airborne bacteria and fungi concentrations. *Soumis à Journal of Occupational & Environmental Hygiene*

Article 3 : Rapid quantification of viable fungi in hospital environments: Analysis of air and surface samples using solid-phase cytometry. *Soumis à Journal of Hospital Infection*

Article 4 : Possible application of the Environmental Relative Moldiness Index in France: A pilot study in Brittany. *Accepté dans International Journal of Hygiene and Environmental Health* doi: 10.1016/j.ijheh.2012.06.004

Article 5 : Correlation between Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) values in French dwellings and other measures of fungal contamination. *Accepté dans Science of the Total Environment* doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.08.085

Dans les prochains chapitres, les articles 2 à 5 seront présentés en détaillant les éléments de contexte et les principaux résultats obtenus. Une dernière partie discutera de manière transversale l'ensemble des travaux effectués et ouvrira sur des perspectives dans le domaine étudié.

Chapitre 2. Evaluation de la contamination microbienne de l'air par la méthode d'impaction sur gélose

Introduction

Les prélèvements d'air sont souvent effectués lors des contrôles environnementaux car ils sont représentatifs de ce qui est respiré par les occupants des locaux. Parmi les nombreux biocollecteurs, les appareils à impaction sont fréquemment utilisés car ils ont en général une autonomie électrique et sont facilement portables (Yao & Mainelis 2007). Cette technique de prélèvement est recommandée par la norme internationale ISO 14698-1 qui est appliquée dans les hôpitaux (ISO 14698-1 2003). L'efficacité des stratégies de prévention est en effet évaluée dans les zones protégées et dans les services équipés d'unités mobiles de traitement de l'air (Gangneux et al. 2006; Fréalle et al. 2011). De plus, la norme ISO 16000-18 décrit spécifiquement les exigences pour l'échantillonnage par impaction dans le cadre de l'évaluation de la qualité de l'air intérieur (ISO 16000-18 2011).

Ces systèmes de collecte reposent sur les propriétés d'inertie des particules (Figure 6). En effet, l'air aspiré est brusquement accéléré lors du passage dans une série d'orifices (grille ou crible) et est brutalement dévié par la surface d'un milieu gélosé. Les particules vont, selon leur inertie, soit suivre les lignes de courant du fluide, soit s'impacter sur le milieu de culture pour celles possédant l'inertie la plus importante. Après une période d'incubation, les micro-organismes qui se sont développés peuvent être directement dénombrés sur la gélose et être identifiés selon des critères microscopiques.

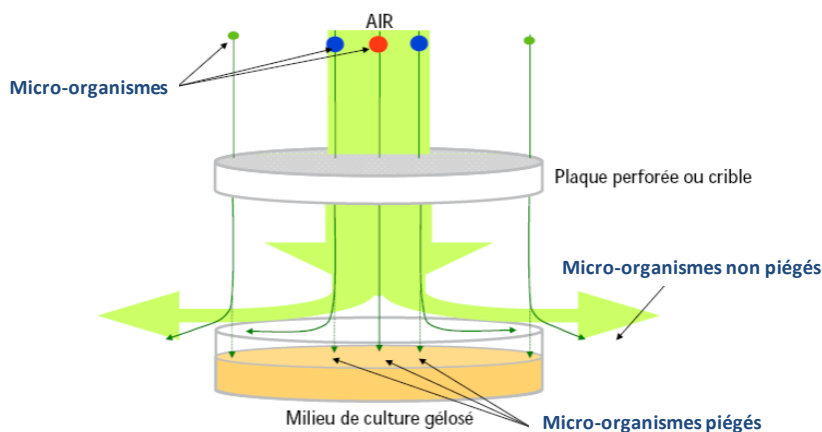


Figure 6. Principe de l'échantillonnage des bioaérosols par la méthode d'impaction sur gélose (D'après Andersen 1958)

Depuis le premier modèle d'impacteur (Andersen 1958), plusieurs études ont montré que l'efficacité de collecte des appareils varie selon leurs caractéristiques techniques (Whyte et

al. 2007; Yao & Mainelis 2006) : le débit de l'air échantillonné, la distance entre la grille et le support de collecte, les caractéristiques du crible (tels que le nombre, le diamètre et la répartition des orifices), sont autant d'éléments déterminants. De plus, les performances des appareils à impaction ne sont généralement pas connues lors d'une utilisation en conditions réelles, et peu de données sont disponibles pour comparer les appareils présents sur le marché. Ainsi, l'objectif de notre travail a été d'étudier les performances de collecte de trois impacteurs présentant des caractéristiques techniques distinctes : le Sampl'Air (AES Chemunex), l'Air Ideal (bioMérieux) et le BACTair raccordé au collecteur Airport MD8 (Sartorius). Un protocole de prélèvements a été mis en place dans des environnements du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Rennes afin de comparer les concentrations bactériennes et fongiques obtenues à différents niveaux de contamination (Article 2).

Résultats et Discussion

Dans cet article, les performances de collecte des trois impacteurs ont été évaluées dans une chambre à flux laminaire, une chambre conventionnelle et une salle d'archives. Neuf prélèvements d'air ont été effectués par pièce pour chaque appareil et chaque milieu de culture. Les concentrations en bactéries ont été déterminées sur des géloses Trypticase soja incubées à 37°C pendant 3 jours, alors que le dénombrement des moisissures a été effectué sur des milieux Sabouraud après 5 jours d'incubation à 30°C. Cette étude a montré que les trois appareils testés avaient globalement des performances similaires pour collecter les micro-organismes présents dans l'air. En effet, une différence significative a été observée dans un seul des trois environnements hospitaliers contrôlés : le Sampl'air a collecté significativement plus de bactéries que les deux autres appareils dans une chambre de patients. Ce résultat peut être en partie expliqué par une meilleure efficacité physique de collecte pour cet impacteur : son diamètre de coupure d_{50} (correspondant au diamètre aérodynamique pour lequel l'efficacité de rétention est de 50 %) égal à 0.5 μm est effectivement plus petit que celui de l'Air Ideal (1.20 μm) et celui du BACTair (0.79 μm). Cependant, les concentrations microbiennes déterminées sur les milieux de culture peuvent aussi être influencées par le degré d'enfoncement des micro-organismes dans la gélose et par le phénomène de rebond des particules sur la surface gélosée (Stewart et al. 1995; Trunov et al. 2001). De plus, lors de ce prélèvement actif, les micro-organismes peuvent être stressés ; ce qui nuit à leur développement ultérieur. On peut ainsi caractériser les impacteurs selon leur performance biologique, qui se définit comme leur capacité à maintenir la cultivabilité des particules biologiques collectées.

Les prélèvements d'air dans une même pièce ont été effectués simultanément par les trois appareils disposés à différentes places. Il a été constaté que les concentrations microbiennes étaient sujettes à des variations spatiales dans les environnements les plus

contaminés (la chambre conventionnelle pour les bactéries et la salle d'archive pour les moisissures). Les variations spatio-temporelles sont l'une des limitations majeures de la stratégie d'échantillonnage des bioaérosols (Crawford et al. 2009). C'est pourquoi l'interprétation des prélèvements d'air doit être basée sur de multiples échantillons (OMS 2009).

La méthode de prélèvement par impaction présente un certain nombre de contraintes. Le volume d'air prélevé, généralement compris entre 50 L à 1000 L, doit être adapté à la charge microbienne de l'air pour éviter la saturation des géloses. Ainsi la norme ISO Air Intérieur recommande de prélever deux volumes d'air différents avec deux répétitions par volume pour chaque point de prélèvement (ISO 16000-18 2011). Les échantillons destinés à des analyses par culture doivent être livrés le plus rapidement possible au laboratoire, dans les 24 heures après la collecte. Généralement les échantillons sont transportés à l'abri de la lumière dans une enceinte réfrigérée à 4°C, afin de limiter le développement des micro-organismes (Duquenne & Greff-Mirguet 2005). Une attention particulière doit être portée sur le choix de milieux de culture et sur les conditions d'incubation, notamment la température, qui sélectionnent les micro-organismes susceptibles de se développer (Nieguitsila et al. 2011). Enfin, il est indispensable d'effectuer plusieurs lectures au cours de la période d'incubation, car certaines espèces envahissantes peuvent gêner le développement des autres micro-organismes.

Les méthodes de culture traditionnelles se sont avérées être d'une utilité limitée pour l'évaluation quantitative de l'exposition (OMS 2009). En effet, des résultats qualitatifs sont généralement obtenus, plutôt que des données quantitatives. Cependant, cette approche peut être intéressante en évaluation du risque car tous les champignons ne sont pas sources du même risque. Par exemple, les géloses impactées en environnement hospitalier sont souvent mises à incuber à 37°C afin de révéler les champignons pathogènes thermophiles, tels que les *Aspergillus*. De même, une comparaison qualitative de la flore fongique à l'intérieur et à l'extérieur des bâtiments peut donner une information importante sur les sources potentielles de contamination intérieure.

**Comparative evaluation of three impactor samplers for measuring
airborne bacteria and fungi concentrations**

Delphine Méheust^{1,2,*}, Jean-Pierre Gangneux^{1,3,4}, Pierre Le Cann^{1,2}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U1085, Institut de Recherche Santé, Environnement & Travail (IRSET), F-35043 Rennes, France;

²Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP), F-35043 Rennes, France;

³Université de Rennes 1, Faculté de Médecine, F-35043 Rennes, France;

⁴Centre Hospitalier Universitaire de Rennes (CHU), Service de Parasitologie-Mycologie, F-35033 Rennes, France.

*Corresponding author: Delphine Méheust, EHESP, Avenue du Professeur Léon Bernard CS74312 – 35043 Rennes Cedex, France.

Tel: 33 (0) 2 99 02 29 22; Fax: 33 (0) 2 99 02 29 29; e-mail: Delphine.Meheust@ehesp.fr

Keywords: bioaerosol; sampler performance; fungi; bacteria; field study

Word count: 1507

ABSTRACT

Portable microbial samplers are very useful for detecting microorganisms in the air. However, limited data are available on their performance characteristics when sampling airborne biological agents in a routine practice. The purpose of our study was to compare the bacterial and fungal concentrations obtained in field conditions using three impactor samplers with different designs (AES Chemunex Sampl'Air, bioMérieux Air Ideal, and Sartorius AirPort MD8/BACTair). The linearity of mold collection was tested in the range of 100 L to 1000 L, and all the devices had a correlation coefficient higher than 0.95. For optimal comparison of the samplers, experiments were performed in different hospital rooms with varying levels of air biocontamination. Each sampling procedure was repeated to assess reproducibility. No significant difference between the samplers was observed for the mold concentrations on Sabouraud agar, whereas Sampl'Air collected significantly more bacteria on tryptic soy agar than Air Ideal and BACTair in one of the investigated sites. Impactor location in the room was nevertheless associated with the variability observed with the three samplers at the highest microbial concentration levels. On the basis of their performance, autonomy and simplicity of use, these three impactors are suitable for routine indoor evaluation of microbial air contamination.

INTRODUCTION

Human exposure to airborne biological agents in hospital, residential, occupational, and industrial settings has been shown to cause a variety of adverse health effects.^(1,2) Assessing exposure to bioaerosols requires reliable devices. Several portable microbial samplers are commercially available for identifying and enumerating airborne microorganisms; however there is a lack of information concerning the comparability of the measurement methods.⁽³⁾

Bioimpactors offer certain advantages over other samplers as they are lightweight, battery operated, and collect viable microorganisms at a high flow rate directly on agar media.⁽⁴⁾ The design of the samplers is nevertheless known to influence their efficiencies for measuring airborne microbial concentrations.^(5,6) A bioaerosol sampler can be characterized by its physical and biological performances. Physical performance of an aerosol sampler is described by its collection efficiency curve and its cut-off size, or d_{50} (the particle size at which the sampler has a collection efficiency of 50%). Biological performance is characterized by the impactor's ability to maintain culturability of collected biological particles. Previously, the performances of several portable samplers were investigated when sampling aerosolized bioaerosols of different sizes.^(5,7) In these studies, it was shown that the collection efficiency of an impactor varies with nozzle size, jet-to-plate distance and jet velocity. In addition, degree of embedding, sampling stress and particle bounce were also found to affect its biological performances.^(8,9) Only a few studies have compared the collection performances of air samplers in field conditions, especially in hospitals,⁽¹⁰⁻¹²⁾ where environmental surveillance programs are implemented to control the infectious risk.⁽¹³⁾ Thus the purpose of this field study was to investigate the comparative performance of three specific impactors for sampling airborne bacteria and fungi in different hospital environments.

MATERIALS AND METHODS

Description of the devices

Three impactors with distinctive design features were evaluated (Table I). The samplers were commercially available at the time of the study: Sampl’Air (AES Chemunex, France), Air Ideal (bioMérieux, France), and AirPort MD8/BACTair (Sartorius, Germany). These impactors are particularly used in Europe in different environments (such as hospitals, food and pharmaceutical industries). Sampl’Air and Air Ideal share specific characteristics: airflow

of 100 L/min, impaction on standard 90 mm diameter Petri dishes. Unlike the Air Ideal plastic sieve of 265 holes, the Sampl'Air sieve is made of stainless steel and has 258 holes. In this study, the AirPort MD8 sampler was used at a flow rate of 125 L/min. BACTair™ culture media plates are ready-to-connect to this sampler, and have a particular design which also acts as an integrated disposable sieve of 400 holes. With this different design of the sampling head, the air is exhausted through one central outlet and several side outlets after particle impaction onto the medium surface. For convenience, the term “BACTair” will be used in this article to refer to this technology from Sartorius. The three air samplers are portable and battery-operated. Impactor flow rates were previously calibrated.

Linearity of the mold collection

The linearity of the fungal spore collection was tested depending on the sampled volumes. Three repeats of five different air volumes were performed simultaneously with each sampler. Impactors were placed 3 m apart at a height of 1.5 m in a naturally ventilated laboratory room. Mold colony forming units (CFU) were enumerated on Sabouraud agar plates after five days at 25°C.

Evaluation at different levels of microbial contamination

Samplers were compared in three hospital environments expected to have different microflora concentrations: laminar airflow room, conventional room, archive room. Air sampling volumes were, respectively, 1000 L, 250 L, and 100 L. They were adapted to the presumed levels of contamination in the different environments in order to avoid overcrowding on the plates. As the BACTair device has the highest airflow, the sampling duration was a little shorter with this impactor than with the others. The samplers were used simultaneously in 3 locations and were placed 2 m apart. After three successive samplings, the impactor positions were exchanged. To avoid artificial effects caused by air turbulence, minimal activity

occurred during samplings. In each room, 9 samples were collected for each impactor and for each medium. Tryptic Soy Agar Petri dishes (TSA) were incubated for 3 days at 37° C and Sabouraud agar Petri dishes for 5 days at 30° C to enumerate bacteria and molds, respectively. Filamentous fungi were identified to genus level on the basis of colonial and microscopic morphology. The CFU numbers were adjusted using a “positive-hole” correction table according to the manufacturer’s instructions (this statistical correction depends on the number of holes in the sieve).

Statistical analysis

Statistical data analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Linear regression was determined on the mold collection data for each impactor. After normal distribution tests on the microbial concentrations in hospital environments, a Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the number of CFU/m3 of air as a function of sampling device (n=3) and sampling location in the rooms (n=3). A *p* value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Mold collection with the three impactors was linear in the range of 100 to 1000 L of air: correlation coefficients were higher than 0.95 (Figure 1). The slopes were not significantly different between the three samplers (*p* = 0.22).

As presumed, the levels of microbial contamination were different in the investigated hospital environments (Tables II and III). The highest bacterial concentrations were obtained in a conventional patient room (Figure 2), whereas the highest mold concentrations were found in the archive room (Figure 3).

The Two-way ANOVA results from all the data values revealed no significant differences among the sampling devices with regard to bacterial and mold concentrations, except for

bacterial collection in the conventional room (Figure 2). Sampl'Air collected significantly more bacteria on TSA medium than the other devices in this environment ($p = 0.03$): 121 CFU/m³ versus 92 and 93 CFU/m³ for Air Ideal and BACTair, respectively. Impactor location was nevertheless associated with variability in the concentrations obtained with the three samplers ($p = 0.03$) and no interaction was found between location and device ($p = 0.51$). Impactor location in the archive room was also associated with variability in the mold counts on Sabouraud agar ($p = 0.01$) (Figure 3). However fungal collection performances of the tested devices were not significantly different in this room ($p = 0.18$). The high standard deviation for mold concentrations obtained with Sampl'Air (41 ± 9 CFU/m³) may reflect the heterogeneity of ambient bioaerosol concentration in the archive room (Figure 2). *Cladosporium*, *Penicillium*, and *Aspergillus* were the main fungal genera collected, with no significant differences between the samplers.

DISCUSSION

This study shows that the three commercially available impactors are efficient at collecting microorganisms from indoor air with varying degrees of contamination. The assessment was not performed under controlled conditions (i.e., in an experimental room with defined levels of airborne microorganisms) as our intention was to reflect the practical conditions in which these samplers are used for monitoring microbial contamination in the hospital environment. For optimal comparison of the impactors, each sampling procedure was repeated at each site to take into account spatial variations within a room. Spatial variation is indeed a well-known limitation of air sampling strategy in indoor environments.^(14,15) Furthermore we summarized technical features important for professionals, such as the sampler weight and its autonomy (Table I).

The microbial concentrations obtained were coherent with the suspected levels of contamination (Table II and III). The results obtained in the laminar airflow room showed the efficiency of the air-control measures in this hospital environment (provided with high efficiency particulate filters, class H14). Environmental surveillance programs are particularly implemented in this high risk area for infection. Because papers are known to be fungal reservoirs,⁽¹⁶⁾ we also chose an archive room to better assess the collection performances of the impactors at a higher level of contamination (about 40 CFU/m³ in this study).

In some studied environments, differences were observed between the culturable bacteria and fungi concentrations measured by these samplers. They may be explained by various competing factors including both physical and biological parameters: microbial species, sampling stress, and physical collection efficiencies.⁽⁶⁾ The Sampl’Air impactor has a smaller cut-off size, about 0.50µm, thus in theory it collects more microbial cells onto the agar surfaces, especially bacteria, than the Air Ideal and BACTair samplers with their respective cut-off sizes of 1.20µm and 0.79µm (Table I). When sampling in natural environments, however, the difference between the physical collection efficiencies could change due to the fact that microbial cells might appear as aggregates or harbour on larger inert particles. Furthermore, the impaction velocity (characterized by the sampler’s operating flow rate and inlet design) is unique for each sampling device, and the resulting impaction stress influences the culturability of the microorganisms.⁽⁸⁾

CONCLUSIONS

Despite their specific design features, the three samplers tested showed similar bacterial and fungal collection performances. These results were obtained in a field study in hospital environments with varying levels of air contamination. On the basis of their performance,

1
2
3 autonomy and simplicity of use, we conclude that the three tested impactors are suitable for
4
5 routine indoor evaluation of microbial air contamination.
6
7

8 9 **ACKNOWLEDGMENTS**

10
11
12 This work was supported by an EHESP Doctoral Network Fellowship. The authors declare
13
14 that there are no conflicts of interest.
15
16

17 18 **REFERENCES**

- 19
20
21 1. **Douwes, J., P. Thorne, N. Pearce, and D. Heederik:** Bioaerosol Health Effects and
22
23 Exposure Assessment: Progress and Prospects. *Ann. Occup. Hyg.* 47(3):187-200 (2003).
24
25
26 2. **Kummer,V., and W.R. Thiel:** Bioaerosols - Sources and control measures. *Int. J. Hyg.*
27
28 *Environ. Health.* 211(3-4):299-307 (2008).
29
30
31 3. **Engelhart, S., and M. Exner:** Short-term versus long-term filter cassette sampling for
32
33 viable fungi in indoor air: comparative performance of the Sartorius MD8 and the GSP
34
35 sampler. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 205(6):443-451 (2002).
36
37
38 4. **Yao, M., and G. Mainelis:** Use of portable microbial samplers for estimating inhalation
39
40 exposure to viable biological agents. *J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol.* 17(1):31-38 (2007).
41
42
43 5. **Whyte, W., G. Green, and A. Albisu:** Collection efficiency and design of microbial air
44
45 samplers. *J. Aerosol Sci.* 38(1):97-110 (2007).
46
47
48 6. **Yao, M., and G. Mainelis:** Effect of physical and biological parameters on enumeration of
49
50 bioaerosols by portable microbial impactors. *J. Aerosol Sci.* 37(11):1467-1483 (2006).
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

7. **Grinshpun, S.A., A. Adhikari, S.-H. Cho, K.-Y. Kim, T. Lee, and T. Reponen:** A small change in the design of a slit bioaerosol impactor significantly improves its collection characteristics. *J. Environ. Monitor.* 9(8):855 (2007).

8. **Stewart, S., S. Grinshpun, K. Willeke, S. Terzieva, V. Ulevicius, and J. Donnelly:** Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(4):1232-1239 (1995).

9. **Trunov, M., S. Trakumas, K. Willeke, S.A. Grinshpun, and T. Reponen:** Collection of Bioaerosol Particles by Impaction: Effect of Fungal Spore Agglomeration and Bounce. *Aerosol Sci. Tech.* 34(6):490 (2001).

10. **Engelhart, S., A. Glasmacher, A. Simon, and M. Exner:** Air sampling of *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi: Comparative performance of the Sartorius MD8 airport and the Merck MAS-100 portable bioaerosol sampler. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 210(6):733-739 (2007).

11. **Gangneux, J.-P., F. Robert-Gangneux, G. Gicquel, et al.:** Bacterial and fungal counts in hospital air: Comparative yields for 4 sieve impactor air samplers with 2 culture media. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 27(12):1405-1408 (2006).

12. **Nesa, D., J. Lortholary, A. Bouakline, et al.:** Comparative performance of impactor air samplers for quantification of fungal contamination. *J. Hosp. Infect.* 47(2):149-155 (2001).

13. **Gangneux, J.-P., J.L. Poirot, O. Morin, et al.:** Surveillance mycologique de l'environnement pour la prévention de l'aspergillose invasive: Propositions de standardisation des méthodologies et des modalités d'application. *Presse Med.* 31(18):841–848 (2002).

- 1
2
3 14. **Crawford, C., T. Reponen, T. Lee, et al.:** Temporal and spatial variation of indoor and
4 outdoor airborne fungal spores, pollen, and (1→3)-β-d-glucan. *Aerobiologia*. 25(3):147-158
5 (2009).
6
7
8
9
10 15. **Hyvärinen, A., M. Vahteristo, T. Meklin, M. Jantunen, A. Nevalainen, and D.**
11 **Moschandreas:** Temporal and Spatial Variation of Fungal Concentrations in Indoor Air.
12 *Aerosol Sci. Tech.* 35(2):688 (2001).
13
14
15
16
17 16. **Bronislaw, Z.:** Fungi isolated from library materials: A review of the literature. *Int.*
18 *Biodeter. Biodegr.* 40(1):43-51 (1997).
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURES

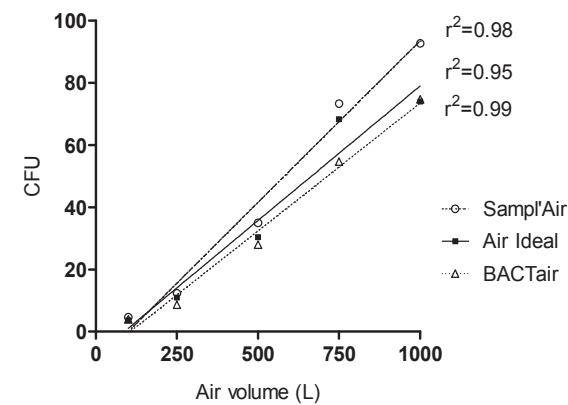


FIGURE 1. Linear regression on the numbers of mold colony forming units depending on the sample air volumes for each impactor.

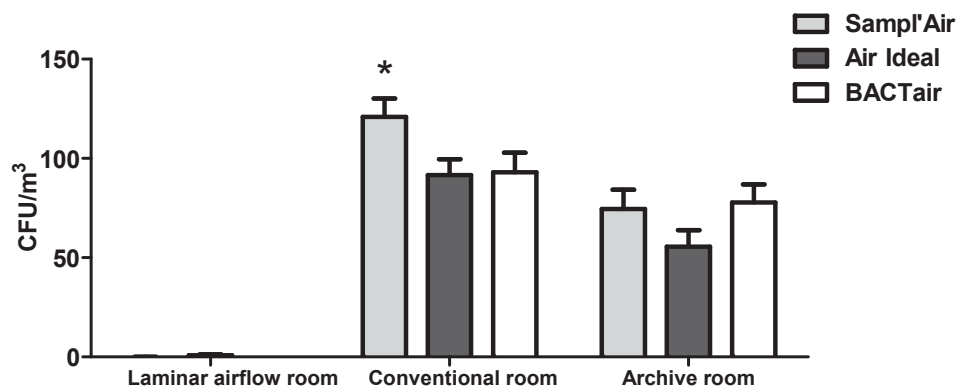


FIGURE 2. Comparison of bacteria concentrations with the 3 impactor samplers on Tryptic soy agar from air samples collected at different hospital sites. Whiskers indicate ± 1 standard deviation of the mean.

* Significant difference between Sampl'Air and the other samplers ($p < 0.05$)

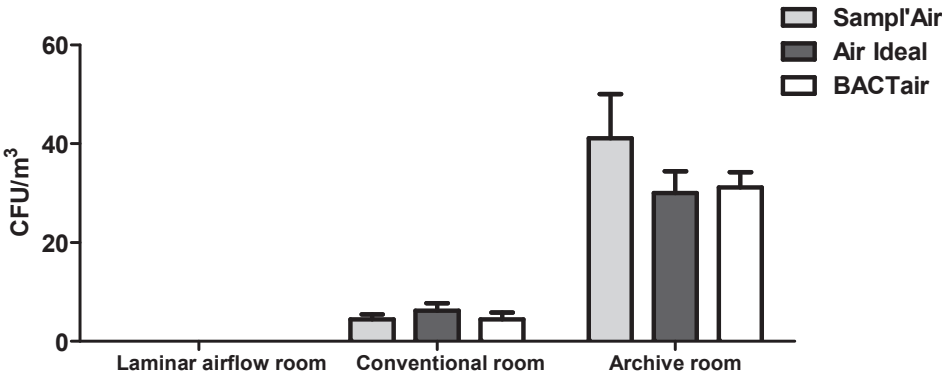


FIGURE 3. Comparison of mold concentrations with the 3 impactor samplers on Sabouraud agar from air samples collected at different hospital sites. Whiskers indicate ± 1 standard deviation of the mean. (no significant difference between the samplers)

TABLE

TABLE I. Technical features of the three evaluated impactors, according to the manufacturer's data.

	Sampl'Air	Air Ideal	AirPort MD8/BACTair
Manufacturer	AES Chemunex, France	bioMérieux, France	Sartorius, France
Airflow	100 L/min +/- 5%	100 L/min +/- 6.5%	30, 40, 50, 125 L/min
Sieve	in stainless steel, 258 holes of 0.7 mm	in PVDF (polyvinylidene fluoride), 265 holes	in polystyrene, 400 holes of 0.47 mm
Culture plate	Standard 90 mm diameter plate	Standard 90 mm diameter plate	BACTair™ culture plates (116 x 24 mm)
Average jet velocity	16.8 m/s	< 20 m/s	30 m/s
Cut-off size d₅₀	0.5 µm	1.20 µm	0.79 µm
Weight	1.8 kg	1.2 kg	2.5 kg
Battery/Autonomy	NiMH 9.6V 25 cycles of 10 min	6 NiMH batteries of 1.2V 4h	NiMH 16.8V 4h at 125L/min

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

TABLE II. Bacteria concentrations (CFU/m³) obtained with the 3 impactor samplers on Tryptic soy agar from air samples collected at different hospital sites.

	Sampl'Air	Air Ideal	AirPort MD8/BACTair
Laminar airflow	n=9	n=9	n=9
Median (Range)	0 (0-1)	0 (0-5)	0 (0-0)
Mean (Standard deviation)	0.1 (0.3)	0.9 (1.7)	0 (0)
Conventional room	n=9	n=9	n=9
Median (Range)	120 (84-168)	88 (52-140)	100 (24-132)
Mean (Standard deviation)	120.9 (27.8)	91.6 (23.9)	92.9 (29.7)
Archive room	n=9	n=9	n=9
Median (Range)	70 (30-120)	50 (10-90)	70 (50-130)
Mean (Standard deviation)	74.4 (29.2)	55.6 (25.1)	77.8 (27.3)

TABLE III. Mold concentrations (CFU/m³) obtained with the 3 impactor samplers on Sabouraud agar from air samples collected at different hospital sites.

	Sampl'Air	Air Ideal	AirPort MD8/BACTair
Laminar airflow	n=9	n=9	n=9
Median (Range)	0	0	0
Mean (Standard deviation)	0	0	0
Conventional room	n=9	n=9	n=9
Median (Range)	4 (0-8)	8 (0-12)	4 (0-12)
Mean (Standard deviation)	4.4 (3.1)	6.2 (4.5)	4.4 (4.2)
Archive room	n=9	n=9	n=9
Median (Range)	40 (0-80)	30 (10-50)	30 (20-50)
Mean (Standard deviation)	41.1 (26.7)	30 (13.2)	31.1 (9.3)

Chapitre 3. Quantification de la flore fongique viable par cytométrie en phase solide

Introduction

La méthode culturale est l'approche traditionnelle pour dénombrer les moisissures. Cette méthode est notamment utilisée pour la surveillance fongique de l'environnement hospitalier. Les conditions d'incubation sont en général choisies pour favoriser la recherche d'*Aspergillus* spp. dans les échantillons environnementaux. Or, différentes études ont montré que le risque infectieux ne se limite pas à ce groupe fongique, et que des levures telles que *Candida* spp. et diverses moisissures (dont des Zygomycètes, *Fusarium*, etc.) sont à l'origine d'infections chez des patients immunodéprimés (Fleming et al. 2002; Nucci et al. 2010). De plus, seules les cellules cultivables sont dénombrées sur des milieux gélosés et la fraction viable non cultivable de la flore fongique n'est pas prise en compte. Les champignons viables de l'environnement ont cependant le potentiel d'infecter les personnes les plus fragiles.

Dans l'article 3, une technologie de cytométrie en phase solide a été testée afin de quantifier la flore fongique viable présente dans des échantillons environnementaux hospitaliers, comparativement à la culture mycologique. Des prélèvements d'air et de surface ont été réalisés dans différents services du CHU de Rennes. Dans le cadre des plans de surveillance environnementale, l'intérêt de l'approche quantitative par cytométrie a été discuté.

Résultats et Discussion

La technologie de cytométrie en phase solide a été développée par l'entreprise AES Chemunex afin de réduire les temps d'analyses des contrôles microbiologiques effectués dans les usines de production d'eau destinée à la consommation humaine, et dans l'industrie pharmaceutique (Rolland et al. 1999). Dans cette étude, un protocole récent de quantification de la flore fongique viable a été testé (Figure 7). Cette technologie allie la filtration de l'échantillon sur une membrane spécifique, le marquage direct des micro-organismes viables, et le dénombrement des cellules fongiques par cytométrie à balayage laser. Le substrat de viabilité utilisé est dégradé par des enzymes estérases, permettant ainsi l'accumulation de fluorochromes dans le cytoplasme des cellules viables ayant une membrane intacte. Les micro-organismes marqués sont détectés par le cytomètre et discriminés par un logiciel ; celui-ci permet aussi une validation microscopique ultérieure par l'opérateur.

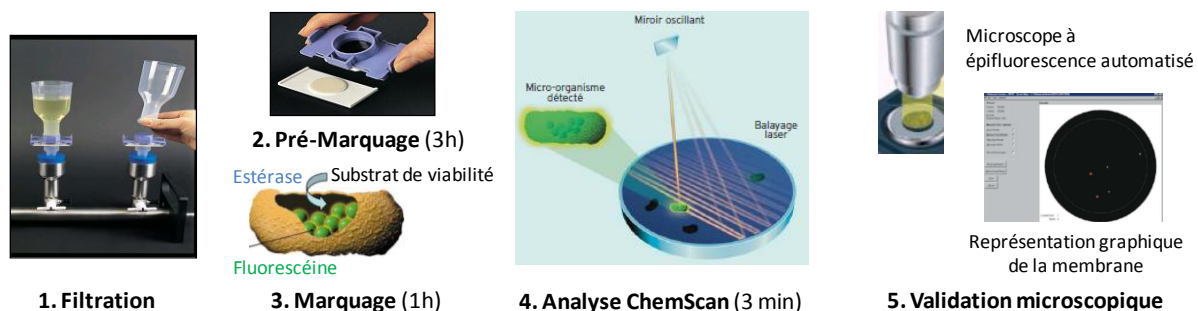


Figure 7. Protocole de quantification de la flore fongique viable par cytométrie en phase solide (D'après document ChemScan® RDI, AES Chemunex)

Notre protocole d'évaluation et les résultats obtenus sont discutés dans l'article 3 actuellement soumis pour publication.

Dans les prélèvements d'air provenant de trois environnements hospitaliers différents, les concentrations de champignons viables étaient environ 1,5 fois plus élevées que les concentrations obtenues par culture sur des géloses à l'extrait de malt. Ces rapports de concentrations ont aussi été constatés dans d'autres environnements intérieurs (Vanhee et al. 2008). Dans les prélèvements de surface réalisés dans le service d'hématologie ou le laboratoire de mycologie, aucune différence significative n'a pu être observée entre les deux méthodes analytiques. On note toutefois une tendance à ce que les écouvillons ChemSwab (AES Chemunex), compatibles avec l'analyse par cytométrie, permettent une meilleure collecte des champignons que les écouvillons standards en coton. Des échantillons d'eau pourraient aussi être filtrés et analysés suivant le même protocole de cytométrie, car différents travaux ont récemment montré l'intérêt de surveiller la contamination fongique de l'eau dans les hôpitaux (Kauffmann-Lacroix et al. 2008; Sautour et al. 2012). Dans notre étude, la validation microscopique des cellules marquées a notamment permis l'observation de levures bourgeonnantes et de spores morphologiquement caractéristiques (telles que les spores de *Fusarium* et d'*Alternaria*). Cependant une identification plus précise de l'ensemble des champignons marqués n'est pas possible avec la technique de cytométrie en phase solide. De ce point de vue, les analyses par culture permettent d'avoir une photographie de la diversité de la flore fongique cultivable présente dans les environnements, notamment si une identification précise est ensuite effectuée par biologie moléculaire ou spectrométrie de masse MALDI-TOF. Des développements d'immuno-marquage sont néanmoins en cours afin de détecter plus spécifiquement certains groupes fongiques lors de la quantification par cytométrie (Vanhee et al. 2009).

Le protocole testé utilisant la cytométrie en phase solide permet d'avoir rapidement un indicateur global de la flore fongique viable. Il ne paraît pas envisageable d'appliquer cette

technique dans tout type d'environnement intérieur, car la présence importante de poussières dans les échantillons peut perturber le signal de détection. Cependant, ce système est particulièrement bien adapté pour la surveillance environnementale de zones protégées, telles que les services à risque des hôpitaux qui sont équipés de système de traitement d'air. En effet, la valeur cible de la recherche de champignons dans l'air et sur les surfaces sous un flux laminaire correspond à l'absence de champignon filamenteux (Gangneux et al. 2002). Les seuils d'alerte étant très faibles dans ces zones, il est nécessaire d'avoir un seuil de détection très bas. Or, la technique de cytométrie à balayage laser permet la détection d'une seule cellule fongique, certes à un coût non négligeable. Enfin, le principal avantage de cette approche est qu'elle permet l'obtention des résultats en moins de 5 heures, contrairement aux analyses culturales qui prennent plusieurs jours. Ceci peut se traduire par différentes actions dans le domaine hospitalier, telles que la mise en œuvre rapide de mesures de nettoyage et de désinfection, la réouverture de zones à risque après contrôles, et le retour plus précoce des patients dans leur chambre.

Journal of Hospital Infection

Rapid quantification of viable fungi in hospital environments: Analysis of air and surface samples using solid-phase cytometry

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JHI-D-12-00214R2
Full Title:	Rapid quantification of viable fungi in hospital environments: Analysis of air and surface samples using solid-phase cytometry
Corresponding Author:	Delphine Méheust EHESP Rennes, FRANCE
Article Type:	Original Article

Rapid quantification of viable fungi in hospital environments: Analysis of air and surface samples using solid-phase cytometry

Running title: Quantification of viable fungi by cytometry

Delphine Méheust ^{a,b,*}, Pierre Le Cann ^{a,b}, Jean-Pierre Gangneux ^{a,c,d}

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U1085, Institut de Recherche Santé, Environnement & Travail (IRSET), F-35043 Rennes, France;

^b Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP), F-35043 Rennes, France;

^c Université de Rennes 1, Faculté de Médecine, F-35043 Rennes, France;

^d Centre Hospitalier Universitaire de Rennes (CHU), Service de Parasitologie-Mycologie, F-35033 Rennes, France.

*Corresponding author: Delphine Méheust

EHESP, Avenue du Professeur Léon Bernard CS74312 – 35043 Rennes Cedex, France.

Tel: 33 (0) 2 99 02 29 22; Fax: 33 (0) 2 99 02 29 29; e-mail: Delphine.Meheust@ehesp.fr

Keywords: hospital environmental surveillance, viable fungi, solid-phase cytometry

SUMMARY

Background: Environmental surveillance is important in high risk areas of hospitals to prevent fungal infections in immunosuppressed patients. Conventional culture methods for enumerating environmental fungi are time-consuming.

Aim: In this field study, a solid-phase cytometry technique (SPC) and a more conventional culture-based method to quantify fungal contamination of hospital air and surface samples were compared.

Methods: For the air sampling, a liquid cyclone air sampler was used with a flow rate of 300L/min for ten minutes in each of four hospital locations. Surface swabbing was done in two locations, with two different swab types. Samples from all areas were processed by SPC and by culture on malt extract agar.

Findings: The mean airborne concentrations of viable fungi determined by SPC were about 1.5 higher than the mean concentrations obtained with the culture-based method. These differences for air samples were significant in three hospital environments. No significant difference was observed for surface samples between the two swab types and between the two analytical methods. One of the prominent advantages of SPC was its rapidity in comparison to the culture-based method (5 hours versus 5 days).

Conclusion: In this study, we showed that SPC allows for rapid monitoring of viable fungi in hospital environments. SPC can thus be used to provide an early warning and a rapid implementation of corrective measures. Viable fungi detection may be an important tool to assess infectious risk in wards with immunosuppressed patients.

INTRODUCTION

Over the past 20 years, the number of invasive fungal infections has continued to persist, due primarily to the increased numbers of patients subjected to severe immunosuppression.^{1,2}

Monitoring of environmental fungal contamination is strongly recommended, especially for outbreak investigation in epidemic situations and during building construction and renovation work.^{3,4} Moreover, environmental surveillance programs are also useful to assess air control efficiency in wards with high-risk patients.^{5,6}

Culture-based analysis is the conventional approach used for fungal quantification in air and surface samples. However, this method often results in an underestimation of the number of microorganisms, as it detects only culturable microorganisms and is dependent on culture conditions.⁷ Furthermore, it usually requires at least a five-day incubation period to enumerate most of the environmental fungi. In contrast to traditional methods, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) has been developed for specific quantification of fungi and is being used more frequently owing to its low detection limit and high accuracy.^{8,9} It nevertheless does not differentiate between viable and non-viable cells; the viability of a microorganism is still a critical factor during hospital environmental surveillance since it determines infectivity.¹⁰ Moreover, this molecular-based method is nowadays widely used to detect *Aspergillus* species, but other airborne fungi may cause respiratory infections including *Fusarium* and *Zygomycetes* species.¹¹

To reduce the time for the microbiological controls in pharmaceutical and drinking water industries, a rapid assay with high level sensitivity was developed a few years ago¹²: a solid-phase cytometry (SPC) system, using the ChemScan RDI system (AES Chemunex, Bruz, France), is based on direct fluorescent labeling of viable microorganisms, coupled with an ultra-sensitive laser scanning and counting system. It allows for direct detection of a single cell and eliminates the need for cell growth. Fluorescent viability staining is based on the

1 cleavage of carboxyfluorescein diacetate (ChemChrome V6) by esterases, resulting in the
2 formation of fluorescent carboxyfluorescein in intact and metabolically active cells only.¹³ A
3 specific protocol was recently developed to detect fungi in environmental samples. To our
4 knowledge, this protocol was only tested to analyze air samples from various outdoor and
5 indoor locations.^{14,15}

6
7 Thus, in the present study, we investigated the benefits of this system in hospital
8 environmental surveillance. After microbial samplings in different areas, viable fungi in air
9 and surface samples were quantified by SPC. This surveillance strategy was compared with
10 common sampling techniques and conventional culture-based methods.

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 **METHODS**

26
27
28 This study was performed in field conditions in the Teaching Hospital of Rennes (Brittany,
29 France).

30 31 32 33 34 *Air sampling protocol*

35
36
37 Four sites expected to have different amounts of airborne fungi were selected: an office (high
38 level), a conventional room (medium level), a corridor in hematology unit (low level), and a
39 room with laminar air flow (very low level). A liquid cyclone air sampler, Coriolis collector
40 (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France), was used with a flow rate of 300
41 L/min. Airborne microorganisms were sampled in Collection liquid (AES Chemunex) with an
42 initial volume of 15 mL. The sampler was placed in the middle of the room at a height of 1 m
43 above the floor, and ten air samples of 10 min were collected for each site.

Surface sampling protocol

Twenty-five surface samplings per swab type were performed in different departments of the Teaching Hospital of Rennes: the hematology unit (n = 15) and the parasitology-mycology laboratory (n = 10). The ChemSwab (AES Chemunex), a flocked swab, was moistened by the ChemSwab SRK solution, and the excess solution was removed by pressing gently against the wall of the tube. The swabs were turned during sampling on a 100-cm² stainless steel disinfected template. The ChemSwab was transferred into the SRK tube containing 1.25mL of protective solution, and rotated 10 times in the solution before pressing and removing the swab. According to the same protocol, 100 cm² were then sampled with a conventional cotton swab (Dutscher, Brumath, France) moistened with 1.25 mL of sterile saline solution. This sampling was performed at a distance of 5 cm from the ChemSwab sampling.

Culture based-method

One third of the Coriolis liquid volume (equivalent to 1 m³ of air), as well as 500 µL of the suspension for the swabs, were spread on malt extract agar plates (MEA, Merck, Germany) from the same batch. All MEA plates were incubated at 25 °C and fungal colonies were counted on days 3 and 5 (Figure 1). Results for air and surface samples were expressed as CFU per cubic meter, and CFU per 100 cm², respectively.

Solid-phase cytometry

One third of the Coriolis liquid samples and 500 µL of the ChemSwab suspensions were analyzed by solid-phase cytometry (Figure 1). All the following materials and reagents were obtained from AES Chemunex (Bruz, France).

Fungal labeling protocol

The liquid sample was filtered through a 2.0 μm Cycloblack-coated polyester membrane filter. Interfering particles were counterstained by filtration of 1mL CSE/5 to reduce non-specific fluorescence.¹⁶ The filter was transferred to a cellulose pad soaked with 600 μL of the activation medium ChemSol A6 and incubated at 30 °C for 3 h. This pre-labeling step is required to activate the fungal metabolism and to optimize the cells for the following labeling step. Viable microorganisms were fluorescently labeled by incubating the filters at 37 °C for 1 h on a cellulose pad saturated with 600 μL of viability staining reagent (ChemChrome V6 diluted 1:100 in the labeling buffer ChemSol B2).

Laser scanning and microscopic validation

After labeling of the microorganisms, the 25 mm diameter membrane filter was placed in a holder, on top of a support pad moistened with 600 μL of labeling buffer. The filters were subsequently scanned by the ChemScan RDI. This solid-phase cytometer consist of an argon laser, emitting light of 488 nm, and two photomultiplier tubes, which detect the fluorescent light emitted by the labeled cells. The signals produced were processed by a computer, applying a series of software discriminants to differentiate valid signals (labeled fungi) from fluorescent particles. To confirm the detected spots, visual inspection using an epifluorescence microscope (Olympus BX40) equipped with a computer-driven moving stage, was performed. Results for air and surfaces samples were expressed as viable fungi per cubic meter, and viable fungi per 100 cm^2 , respectively.

Statistical analysis

Mean values (\pm SD) were calculated for each set of air samples. After normal distribution tests, a One-way ANOVA was applied to the airborne fungal counts obtained with the culture-based method and the SPC system from the Coriolis samples. The nonparametric

Wilcoxon signed rank test was used to compare the results from the surface samples. A *p* value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Air sampling

The One-way ANOVA analysis showed significant differences between the analytical methods with regard to fungal concentrations in all sites, except in the room with laminar air flow (Figure 2). In this environment, a fungal contamination of only one fungal spore was detected both by culture and by SPC. Significantly higher viable fungi were detected when the Coriolis samples were examined with SPC by comparison with results of cultures: in the office (220 ± 45 viable fungi/m³ vs. 133 ± 31 CFU/m³), in the conventional room (154 ± 30 viable fungi/m³ vs. 98 ± 16 CFU/m³) and in the hematology corridor (31 ± 9 viable fungi/m³ vs. 23 ± 10 CFU/m³).

Surface sampling

Figure 3 shows the fungal densities obtained at each location in the haematology unit and the parasitology-mycology laboratory. Fungal densities were less than 80/100cm² in both departments. No significant difference was observed between the two analytical methods (SPC vs culture), or the different swab types. In the parasitology-mycology laboratory the SPC gave higher counts than culture in 60% of samples, and in the haematology unit in 46% of samples, but these differences were not significant. Overall, ChemSwabs gave higher counts than standard swabs on culture in 16 (64%) of locations, and 9 (90%) of surfaces in the parasitology-mycology laboratory, but the differences were not significant.

Time to obtain results

Fungal counts on malt extract agar were obtained 5 days after culture plate seeding, whereas SPC analysis required less than 5 hours (Figure 1). After four hours of incubation for the pre-labeling and labeling steps, the ChemScan RDI system scanned the filter in only 3 minutes.

DISCUSSION

Prevention of hospital-acquired fungal infections is currently based on air-control measures in hospitals.¹⁷ Environmental surveillance programs have been implemented in order to assess air control efficiency in wards with high risk patients.⁵ Culture-based analysis is usually performed for fungal quantification in air and surface samples. However, the culture results are known to be influenced by different factors, such as the culture conditions and the competition between species. In the present study, we evaluated a system that combines the principles of epifluorescence microscopy and flow cytometry: the ChemScan system allows thus for accurate detection of a single viable fungal cell. This low level of detection is particularly interesting in the hospital areas with low level of microbial contamination. SPC system enables thus a better characterization of the fungal risk than the conventional approach, because some of the viable fungi have the potential to induce infectious disease in immunocompromised individuals. Moreover, there is a significant relationship between environmental fungal contamination in hematology wards and the incidence of invasive nosocomial aspergillosis.¹⁸

Viability staining is based on the principle that only viable cells, which have an intact cell membrane, are able to retain and accumulate free fluorochromes into the cytoplasm (after cleavage of the nonfluorescent substrate by esterase).¹³ Confirmation of the fluorescent events detected by the SPC may be carried out by microscopic examination of the filter. Although a qualitative analysis was not performed in this study, typical spore morphologies have been

1 distinguished in some of our samples (e.g. *Fusarium* and *Alternaria* conidia). As it works on
2 the principle of membrane filtration, there is no limit on the size of sample used and different
3 types of samples may be analyzed. Here we investigated air and surface samples.
4

5
6 Coriolis sampler, a new device that concentrates airborne particles into liquid media, was
7 used in this study.¹⁹ It allows for sampling of a high volume of air in a few minutes; this is an
8 advantage because optimal environmental monitoring in hospitals requires a large sample
9 size. We thus evaluated two detection techniques on the same liquid collection media,
10 avoiding variability due to the sampling conditions. In the laminar airflow room of the
11 hematology unit (with high efficiency particulate filters class H14), the results of air samples
12 confirmed the efficiency of the air-control measures (only one mold was detected by culture
13 in a Coriolis sample). Significantly higher concentrations of viable fungi were detected when
14 the samples were examined with SPC versus the results of cultures on malt extract agar
15 (Figure 2). This is coherent because the SPC technique also detects viable but non-culturable
16 microorganisms present in the air, which cannot be detected with traditional culture method
17 although they can be pathogen. The mean airborne concentrations of viable fungi determined
18 by SPC were about 1.5 higher than the mean concentrations obtained with the culture-based
19 method. These results in the hospital environments are consistent with those previously
20 obtained in different indoor environments.¹⁵
21
22

23
24 Regarding environmental surface sampling, no significant differences were observed between
25 the two swab types overall (Figure 3). However, in the parasitology-mycology laboratory, the
26 ChemSwabs seemed to collect more fungi than the standard swabs. At these high fungal
27 densities, the nylon fibers of the ChemSwabs may allow a higher recovery and higher release
28 capacity than the standard cotton swabs. This could be related to a greater adhesion surface
29 area of the nylon fibers vs cotton swab. As the present study was performed in field
30 conditions, the distance of 5 cm between the two samplings may have an effect on the
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 differences observed between the two swab types. Only a laboratory experiment in controlled
2 conditions may accurately assess the fungal collection efficiency of the ChemSwab compared
3 to a standard cotton swab. It should be noted that standard swabs are not compatible with SPC
4 analysis because of the particles release that can affect the results. Surprisingly, no significant
5 difference was observed between the SPC technique and the culture-based method by
6 analyzing the ChemSwab samples. Because of the limited number of samples, further study
7 is however needed to confirm this result. The ChemSwab coupled with SPC could thus be an
8 alternative method for rapidly characterizing the fungal contamination on surfaces, especially
9 during building construction work. In addition, the SPC system may be also used to analyze
10 hospital water in order to investigate the waterborne route of transmission of fungal
11 infections.²⁰ However, one may keep in mind that the SPC device is expensive (about 200 000
12 \$), and that it should be reserved to specific uses, such as the detection of fungal
13 contamination in wards with high-risk patients. The actual time worked by a technician to
14 analyze one sample with this technique is nevertheless very short (about 6 min, without the
15 incubation steps), and the result is obtained rapidly.

16 A precise identification of a specific fungus detected by SPC was however not possible
17 without complementary methods. From this point of view, culture media allowed for easy and
18 far less costly identification of the fungal diversity after macroscopic and microscopic
19 examination, albeit within 3-5 days. New approaches in SPC based on immunofluorescent
20 labeling are nevertheless in progress. Vanhee et al. recently developed a specific protocol
21 using monoclonal mouse anti-*Aspergillus* antibodies for the quantification of *Aspergillus*
22 *fumigatus* in air samples.²¹ With a unique system, many exposure ways may thus be
23 investigated. Threshold levels for *Aspergillus* conidia in air and water could be determined, as
24 there is still a gap in the existing literature in assessing the fungal infection risk.⁶

1 Finally, the detection of fungal contamination in a hospital site protected by air treatment
2 measures signifies a lack of protection for high risk patients and must thus be corrected as
3
4 soon as possible. SPC is more sensitive and considerably faster than conventional
5
6 enumeration methods since the whole procedure takes 5h to complete versus at least 5 days
7
8 for the culture method (Figure 1). Corrective measures may thus be more rapidly initiated in
9
10 high infection risk areas. Furthermore, patients may return to their rooms sooner after
11
12 cleaning measures and control samplings, as the decision can be made before traditional
13
14 culture results are finalized.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by an EHESP Doctoral Network Fellowship. We thank AES Chemunex for providing materials and reagents for analyses by solid-phase cytometry. The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Lortholary O, Gangneux J-P, Sitbon K, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005–2007). *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1882-1889.
2. Kriengkauykiat J, Ito J, Dadwal SS. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clin Epidemiol* 2011;3:175-191.
3. Fournel I, Sautour M, Lafon I, et al. Airborne *Aspergillus* contamination during hospital construction works: Efficacy of protective measures. *Am J Infect Control* 2010;38:189-194.
4. Berger J, Willinger B, Diab-Elschahawi M, et al. Effectiveness of preventive measures for hemato-oncologic patients undergoing stem cell transplantation during a period of hospital construction. *Am J Infect Control* 2011;39:746-751.
5. Gangneux J-P, Bretagne S, Cordonnier C, et al. Prevention of nosocomial fungal infection: The French approach. *Clin Infect Dis* 2002;35:343 -346.
6. Lee LD, Hachem RY, Berkheiser M, Hackett B, Jiang Y, Raad II. Hospital environment and invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancy. *Am J Infect Control* 2012;40:247-249.
7. Gangneux J, Robert-Gangneux F, Gicquel G, et al. Bacterial and fungal counts in hospital air: Comparative yields for 4 sieve impactor air samplers with 2 culture media. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;27:1405-1408.
8. Morrison J, Yang C, Lin K-T, Haugland RA, Neely AN, Vesper SJ. Monitoring *Aspergillus* species by quantitative PCR during construction of a multi-storey hospital building. *J Hosp Infect* 2004;57:85-87.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
9. Bellanger A-P, Reboux G, Murat J-B, Bex V, Millon L. Detection of *Aspergillus fumigatus* by quantitative polymerase chain reaction in air samples impacted on low-melt agar. *Am J Infect Control* 2010;38:195-198.
 10. Latgé J-P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* 2001;9:382-389.
 11. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clin Infect Dis* 2010;51:561 -570.
 12. Rolland X, Cornet P, Drocourt JL. The ChemScan® RDI: a new in-process control tool combining speed with sensitivity in microbial detection. *Biotech Int II* 1999;2:309–314.
 13. Parthuisot N, Catala P, Lemarchand K, Baudart J, Lebaron P. Evaluation of ChemChrome V6 for bacterial viability assessment in waters. *J Appl Microbiol* 2000;89:370-380.
 14. Vanhee LM, Nelis HJ, Coenye T. Detection and quantification of viable airborne bacteria and fungi using solid-phase cytometry. *Nat Protoc* 2009;4:224.
 15. Vanhee LME, Nelis HJ, Coenye T. Enumeration of airborne bacteria and fungi using solid phase cytometry. *J Microbiol Meth* 2008;72:12-19.
 16. Catala P, Parthuisot N, Bernard L, Baudart J, Lemarchand K, Lebaron P. Effectiveness of CSE to counterstain particles and dead bacterial cells with permeabilised membranes: application to viability assessment in waters. *FEMS Microbiol Lett* 1999;178:219-226.
 17. Tablan OC, Anderson LJ, Besser R, Bridges C, Hajjeh R. Guidelines for preventing health-care--associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Rep* 2004;53:1-36.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
18. Alberti C, Bouakline A, Ribaud P, et al. Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. *J Hosp Infect* 2001;48:198-206.
19. Bellanger AP, Reboux G, Scherer E, Vacheyrou M, Millon L. Contribution of a cyclonic-based liquid air collector for detecting *Aspergillus fumigatus* by QPCR in air samples. *J Occup Environ Hyg* 2011;9:D7-D11.
20. Warris A, Onken A, Gaustad P, et al. Point-of-use filtration method for the prevention of fungal contamination of hospital water. *J Hosp Infect* 2010;76:56-59.
21. Vanhee LME, Nelis HJ, Coenye T. Rapid detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* in environmental air samples using solid-phase cytometry. *Environ Sci Technol* 2009;43:3233-3239.

FIGURES

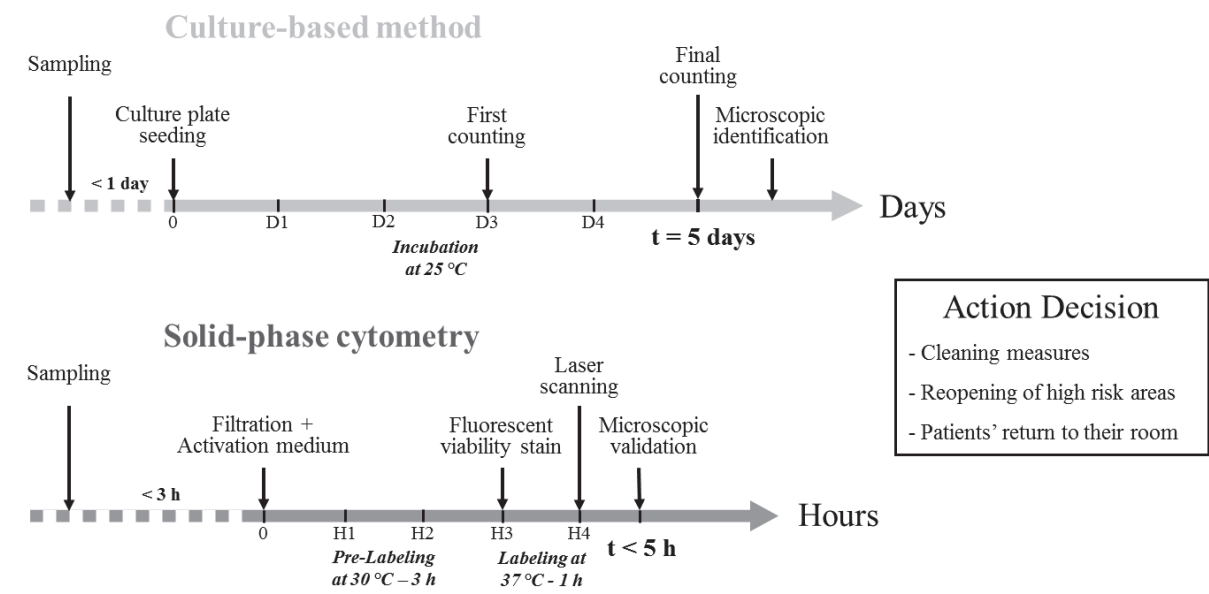


Figure 1.

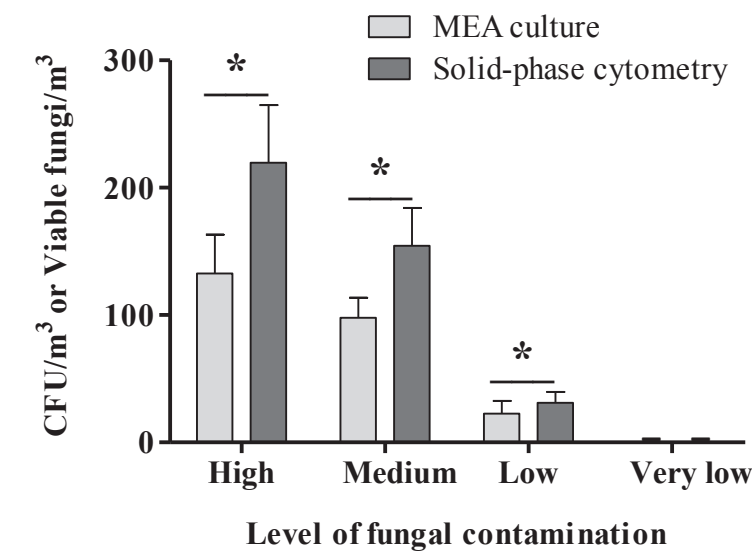


Figure 2.

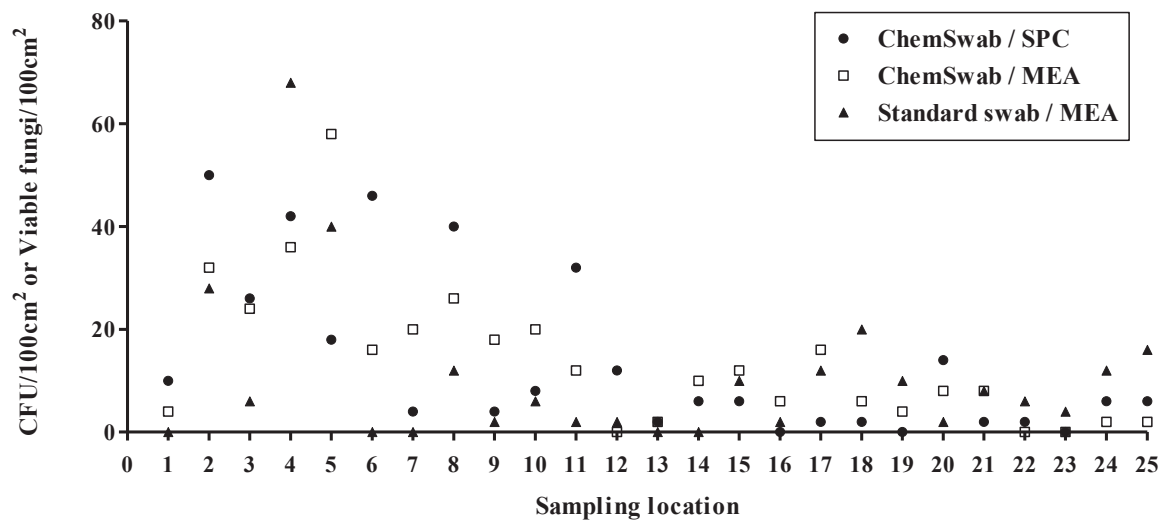


Figure 3.

LEGENDS

Figure 1. Experimental design for the quantification of fungi in hospital environments using culture-based method and solid-phase cytometry.

Figure 2. Comparisons of the culturable and viable fungal concentrations obtained by culture on malt extract agar (MEA) and by solid-phase cytometry after air samplings with the Coriolis system at different hospital sites; bar heights represent mean of 10 samples \pm 1 standard deviation. * indicates a statistically significant difference between the measurements by the two analytical methods ($p < 0.05$).

Figure 3. Culturable and viable fungal densities obtained by culture on malt extract agar (MEA) and by solid-phase cytometry (SPC) after 25 surface samplings with two swab types in the hematology unit (numbers 1 to 10) and in the parasitology-mycology laboratory (numbers 11 to 25).

Chapitre 4. Evaluation d'un outil moléculaire pour l'étude de la contamination fongique des logements

Introduction

L'utilisation de méthodes moléculaires pour étudier les micro-organismes de l'environnement s'est considérablement répandue depuis les vingt dernières années. Ce phénomène est principalement lié au développement de la technique PCR. Le développement plus récent de méthodes de PCR quantitatives (qPCR) offre des avantages pour évaluer l'exposition aux micro-organismes (Peccia & Hernandez 2006). Grâce à leur sensibilité et leur spécificité, ces méthodes permettent en effet d'obtenir rapidement les concentrations de différents groupes cibles (du genre à l'espèce) dans des échantillons environnementaux. De plus, elles sont indépendantes de la cultivabilité et de la viabilité des micro-organismes. Or, les principales composantes fongiques potentiellement responsables de symptômes respiratoires sont présentes dans les particules fongiques, que celles-ci soient viables ou non. Ainsi la technique de PCR quantitative est particulièrement intéressante pour mesurer l'exposition fongique dans les logements.

Dans les années 2000, des chercheurs de l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (*United States Environmental Protection Agency*, EPA) ont développé des outils qPCR pour plus de 100 groupes fongiques (Vesper 2011). Le Département du logement et du développement urbain des États-Unis (*United States Department of Housing and Urban Development*, HUD) et l'agence EPA ont ensuite mis au point un protocole standardisé pour prélever des poussières domestiques, puis ont identifié et quantifié 36 groupes fongiques dans 1096 échantillons provenant d'une campagne représentative des logements américains. Ces travaux ont permis la création d'un indice de contamination fongique environnementale, appelé *Environmental Relative Moldiness Index* (ERMI) (Vesper, McKinstry, Haugland, Wymer, et al. 2007). Pour calculer la valeur de l'indice, les concentrations de 26 moisissures indicatrices de logements moisiss et de 10 moisissures communes de l'environnement extérieur sont quantifiées.

L'objectif de notre travail était de déterminer si l'indice ERMI développé aux USA pouvait être appliqué dans des logements français. Ainsi, une campagne pilote a été effectuée en Bretagne, où dix logements présentant des problèmes d'humidité ou de moisissures et 10 logements contrôles ont été visités. Des prélèvements d'air et de poussières ont été effectués, puis ont été analysés par les 36 outils qPCR (Figure 8). L'ensemble de ce travail est présenté dans l'article 4.

Prélèvements dans les logements

Analyses par PCR quantitative

Indice de contamination fongique des logements

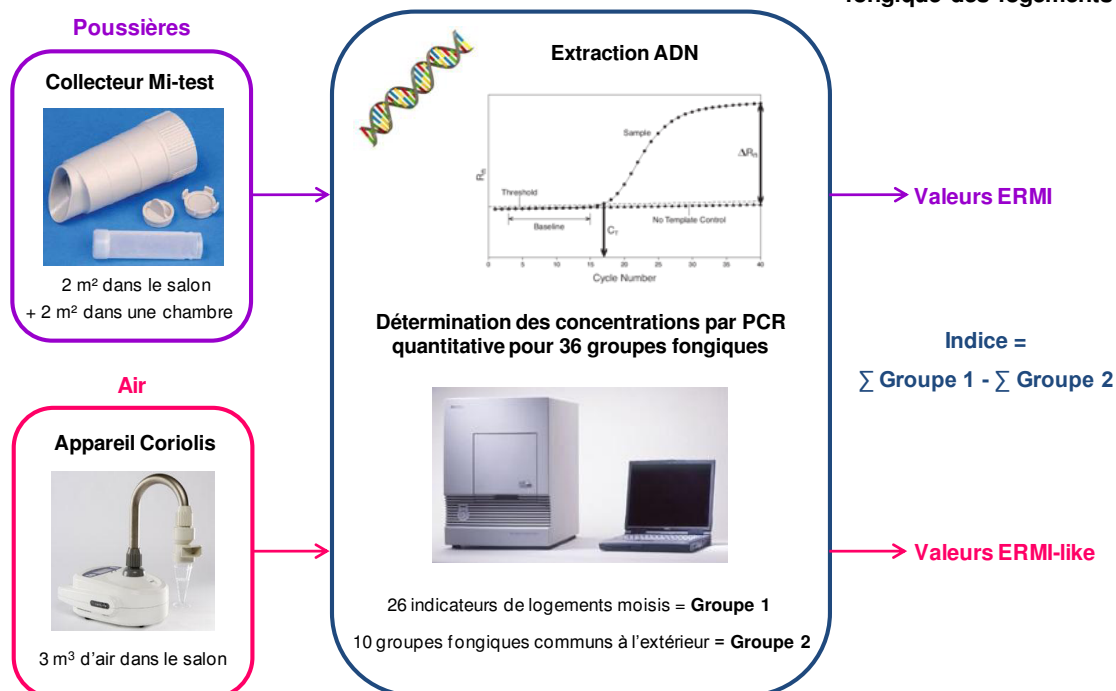


Figure 8. Protocole d'évaluation d'un outil moléculaire pour l'étude de la contamination fongique de logements français

Résultats et Discussion

Lors de l'inspection des logements, les habitats présentant des moisissures visibles ou une odeur de moisi étaient classés dans la catégorie des « Logements moisissés ». Les valeurs ERMI, obtenues à partir des échantillons de poussières prélevées dans le salon et une chambre, concordaient à 90 % avec cette classification. Cependant, elles ont permis de décrire de manière continue le degré de contamination fongique des logements. L'indice ERMI se différencie donc de l'approche dichotomique « moisi » ou « non moisi », qui dépend en partie de l'expérience de l'inspecteur à détecter les problèmes d'humidité et de moisissures. Deux logements initialement considérés comme contrôles sains ont été identifiés comme suspects, car ils avaient une valeur ERMI relativement élevée. Finalement, après réinspection et nouveau contrôle, un des logements avait présenté un dégât des eaux dans une salle de bain 14 mois plus tôt. Il se pourrait que des matériaux de construction encore contaminés par les moisissures soient cachés ; cette situation a été rencontrée à plusieurs reprises dans les campagnes précédentes aux États-Unis (Vesper, McKinstry, Cox, et al. 2009). Dans le second logement, le parquet brossé qui est régulièrement nettoyé à l'eau serait une source potentielle de développement fongique.

En parallèle, un indice ERMI-like a été, pour la première fois, déterminé dans des échantillons d'air prélevés dans le salon. Les valeurs ERMI-like corrélaient significativement

aux valeurs ERMI, et étaient globalement en accord avec la classification de l'inspecteur. Contrairement aux prélèvements d'air qui peuvent être sujets à des variations spatio-temporelles, l'avantage du prélèvement de poussières est l'intégration temporelle présumée du dépôt de micro-organismes de l'air sur le sol. Des corrélations significatives entre les deux types de prélèvements ont d'ailleurs été identifiées pour les concentrations de 7 espèces fongiques.

Des études environnementales antérieures ont permis d'identifier, par des méthodes de microscopie ou de culture, les principaux groupes fongiques présents dans les logements français. Les moisissures souvent retrouvées dans des prélèvements de surface ou d'air en France sont, pour la plupart, quantifiées dans l'indice moléculaire développé aux États-Unis. Le Conseil supérieur d'hygiène publique de France avait, en 2006, établi une liste de moisissures, suspectes d'avoir un rôle en santé publique et qui sont fréquemment retrouvées en environnements intérieurs humides (CSHPF 2006). Sur les 18 groupes fongiques retenus par le groupe de travail « Moisissures dans l'habitat », 15 sont quantifiés dans l'indice ERMI (exceptés les *Fusarium*, *Absidia* et *Trichoderma*).

L'outil moléculaire développé par l'agence EPA permet d'obtenir des données qualitatives et quantitatives sur la flore fongique dans les logements. Environ la moitié des moisissures quantifiées dans les échantillons de poussières français sont retrouvées à des concentrations similaires dans des échantillons américains. Plusieurs moisissures appartenant au groupe 1 de l'indice, moisissures indicatrices de logements moisissés, ont des concentrations significativement supérieures en France (telles qu'*Aspergillus restrictus* et *Wallemia sebi*). Il en est de même pour l'ensemble des espèces du groupe 2 qui sont caractéristiques de l'environnement extérieur. Ce phénomène pourrait être expliqué par des différences entre les modes de ventilation et les habitudes d'aération entre les deux pays. Les fenêtres en France seraient davantage ouvertes qu'aux États-Unis où les systèmes d'air conditionné sont nettement plus fréquents. Ainsi l'échelle ERMI d'évaluation de la contamination fongique ne peut être strictement semblable en France et aux USA.

Pour conclure, l'ensemble des 36 groupes fongiques constituant l'indice ERMI a été retrouvé dans cette étude pilote effectuée en Bretagne. Ces moisissures seraient donc utiles pour décrire la contamination fongique dans les logements en France, en gardant en mémoire que les échantillons analysés sont encore peu nombreux et représentatifs d'une seule région française. Or, la proportion de logements humides n'est pas homogène sur le territoire métropolitain en raison notamment des différences de climat. Les zones à climat océanique telles que la Bretagne sont celles où les logements sont les plus fréquemment humides

(Lalande 2010). Une campagne de prélèvements représentative des logements en France serait donc pertinente pour aboutir à un indice ERMI français.



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

International Journal of Hygiene and Environmental Health

journal homepage: www.elsevier.de/ijheh



Possible application of the Environmental Relative Moldiness Index in France: A pilot study in Brittany

Delphine Méheust^{a,b}, Pierre Le Cann^{a,b}, Tiina Reponen^c, Jennie Wakefield^d, Stephen Vesper^e, Jean-Pierre Gangneux^{a,f,g,*}

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U1085, Institut de Recherche Santé, Environnement & Travail (IRSET), F-35043 Rennes, France

^b Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP), F-35043 Rennes, France

^c University of Cincinnati, Department of Environmental Health, Cincinnati, OH 45267-0056, USA

^d Dynamac Corporation, Cincinnati, OH 45268, USA

^e Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268, USA

^f Université de Rennes 1, Faculté de Médecine, F-35043 Rennes, France

^g Centre Hospitalier Universitaire de Rennes (CHU), Service de Parasitologie-Mycologie, F-35033 Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 January 2012

Received in revised form 6 June 2012

Accepted 30 June 2012

Keywords:

Fungi

Molds

Aspergillus

ERMI

QPCR

Home environment

ABSTRACT

Our goal was to determine if the US Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) scale might have application in France. Twenty homes in Brittany, north western region of France were classified by inspection as “Moldy” or “Non-Moldy”. Dust and air samples were collected (MiTest sampler or Coriolis sampler, respectively) from each home and analyzed by quantitative polymerase chain reaction (QPCR) for the 36 fungi that make-up the ERMI. Inspection and ERMI values provided a consistent assessment for 90% of the homes. Two homes originally classified as “Non-Moldy” were found to fit better into the “Moldy” category based on the QPCR analysis and the ERMI. Dust and air samples analyzed by QPCR provided similar fungal contamination assessments. In conclusion, a metric like the ERMI describes mold burdens in homes on a continuum, as opposed to the frequently used dichotomous approach (moldy vs. non-moldy). Although a larger, random national sampling of French homes is needed, these results suggest that these same 36 fungi may be useful in creating an ERMI for France.

© 2012 Published by Elsevier GmbH.

Introduction

The analysis of fungal populations in homes has commonly been based on the collection of short air samples followed by microscopic enumeration, either directly by observing the conidia/spores or by culturing the fungi on one or two media. The World Health Organization Report (WHO, 2009) described these technologies as having serious drawbacks. One of the major recommendations espoused by the Institutes of Medicine report (IOM, 2004) was the need for the development of molecular-based methods of fungal analysis.

United States Environmental Protection Agency (US EPA) researchers developed quantitative PCR (QPCR) assays, based on unique DNA sequences, for more than 100 fungi (Haugland and Vesper, 2002). Then the US EPA and US Department of Housing and Urban Development (HUD) developed a standardized dust

sampling procedure and identified and quantified 36 fungi in dust samples from a random national sampling of US homes. The result was the creation of the Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) scale for the US (Vesper et al., 2007).

In the development of the ERMI scale, 26 of the fungi were found commonly associated with water-damaged homes (Group 1). Ten of the fungi were common in all homes (Group 2) because they originate primarily from outdoors (vegetation, soil, etc.) (Vesper, 2011). The ERMI was calculated as shown in Eq. (1), by taking the sum of the logs of the concentrations of the 26 Group 1 fungi (s_1) and subtracting the sum of the logs of the concentrations of 10 Group 2 fungi (s_2) (Vesper et al., 2007).

$$\text{ERMI} = \sum_{i=1}^{26} \log_{10}(s_{1i}) - \sum_{j=1}^{10} \log_{10}(s_{2j}) \quad (1)$$

The higher the ERMI, the more mold contamination does the home have. In US homes, the ERMI scale ranges from about –10 to 20 (or higher), and about 25% of homes have ERMI values above 5 (Vesper et al., 2007). Asthma development and exacerbation have been associated with higher ERMI values in the home (Reponen et al., 2011; Kercksmar et al., 2006, respectively).

* Corresponding author at: Service de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine et Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, 2 rue du Pr Léon Bernard, CS34317, 35043 Rennes Cedex, France. Tel.: +33 02 23 23 44 90; fax: +33 02 23 23 46 29.

E-mail address: Jean-pierre.gangneux@univ-rennes1.fr (J.-P. Gangneux).

Table 1
The main fungal species found in dwellings from different parts of France.

Reference	Part of France	Fungal analysis	Fungal species
Bellanger et al. (2009)	Franche-Comté, East of France	Culture and QPCR analysis (air samples and surface samples by swabbing)	<i>Alternaria alternata</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Cladosporium sphaerospermum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Stachybotrys chartarum</i>
Boutin-Forzano et al. (2004)	Marseille area, South East of France	Microscopic identification (surface samples by the gummed paper technique)	Many species including ^a : <i>Acremonium</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Aspergillus glaucus</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Chaetomium</i> sp. <i>Cladosporium sphaerospermum</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Stachybotrys chartarum</i> <i>Ulocladium</i> sp.
Dassonville et al. (2008)	Paris city, North of France	Culture analysis (air samples)	<i>Alternaria</i> sp. <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus</i> sp. <i>Chaetomium</i> sp. <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Cladosporium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Geotrichum</i> sp. <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Stachybotrys</i> sp. <i>Ulocladium</i> sp.
Reboux et al. (2009)	Franche-Comté, East of France	Culture analysis (air samples and surface samples by swabbing)	Many species including ^a : <i>Alternaria</i> sp. <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Eurotium amstelodami</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Ulocladium chartarum</i> <i>Wallemia sebi</i>

Fungal species highlighted in gray are not quantified in the ERMI metric.
^a Fungal species with a frequency of detection equal or higher than 9% in environmental samples.

Most previous studies in French homes have been limited to counting or culturing analyses (Table 1). They allowed, however, the description of major fungal genera and species found in French dwellings. One recent study utilized QPCR to quantify five species of fungi in homes in eastern France and reported significantly higher levels of *Cladosporium sphaerospermum* DNA in air and surface samples from moisture-damaged homes compared to control homes (Bellanger et al., 2009).

In this study, we wanted to determine the potential application of the ERMI scale to describe fungal contamination in French homes. As a pilot study, we sampled 20 dwellings in the Brittany region of France. We compared the standard dust samples to air samples taken with a cyclonic-based liquid air collector (Bellanger et al., 2012) in these same homes.

Materials and methods

Home selection and classification

Twenty homes in north western France (Brittany) were selected for QPCR analysis. The selection of homes was based upon ease of

availability. An inspection was carried-out between January and March 2011 by the same trained person in all the homes that were then placed in categories of “Moldy” or “Non-Moldy”. The “Moldy” homes had visible mold growth or “moldy” odor. Among them, the “Moldy” status was a consequence of water damage or ventilation defaults. This classification was not revealed to the analytical laboratory, until after the fungal analysis was completed.

Dust and air sampling

Dust samples were collected from 20 homes by vacuuming 2 m² in the living room and 2 m² in a bedroom for 5 min each with a Mitest™ sampler-fitted vacuum, directly adjacent to the sofa or bed, respectively. The dust was sieved through a 300 µm pore size mesh to remove large particles and other objects.

The Coriolis cyclone collector (Bertin Technologies, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) was used at a flow rate of 300 L/min to sample 3 m³ of air in the living room of the 20 homes. The inhabitants were asked to not open the windows the day of the visit. Airborne microorganisms were sampled in collection liquid (AES

Chemunex, Bruz, France) with an initial volume of 15 mL. An aliquot of 1.5 mL of the sample was centrifuged at $5000 \times g$ for 15 min and the supernatant fluid was removed to keep the pellet in 100 μ L. The dust and air samples were stored at -20°C until the analysis.

Fungal identification and quantification using QPCR

QPCR analysis was performed on 5.0 ± 0.1 mg of dust. For the air samples, the pellet of 100 μ L was filtered through a 0.2 μ m pore size, 45 mm diameter polycarbonate filter (Millipore Corp) using a Nalgene disposable filtration device (Fisher, product number 09-740-30K). The filter was directly used for the following extraction step. All the samples were spiked with 1×10^6 conidia of *Geotrichum candidum* as an external reference. Each extraction tube was shaken in the bead beater (Biospec Products, Bartlesville, OK) for 1 min and the DNA purified using the DNA-EZ extraction kit (GeneRite, Cherry Hill, NJ).

Methods and assays have been reported previously for performing quantitative PCR (QPCR) analyses (Haugland et al., 2002, 2004). Briefly, the standard reaction assays contained 12.5 μ L of “Universal Master Mix” (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 1 μ L of a mixture of forward and reverse primers at 25 μ M each, 2.5 μ L of a 400 nM TaqMan probe (Applied Biosystems Inc.), 2.5 μ L of 2 mg/mL fraction V bovine serum albumin (Sigma Chemical, St. Louis, MO) and 2.5 μ L of DNA free water (Cepheid, Sunnyvale, CA). To this mix was added 5 μ L of the DNA extract from the sample. All primer and probe sequences used in the assays as well as known species comprising the assay groups are at the web-site: <http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>. Primers and probes were synthesized commercially (Applied Biosystems Inc.).

Reactions were performed with thermal cycling conditions consisting of 2 min at 50°C , 10 min at 95°C , followed by 40 cycles of 15 s at 95°C for template denaturation and 1 min at 60°C for probe and primer annealing and primer extension. The Cycle threshold determinations were automatically performed by the instrument ABI 7900 (Applied Biosystems Inc.) using default parameters. Assays for each target species and the internal reference (*Geotrichum candidum*) were performed in separate tubes of the 96-well plate format.

Statistical analyses

Log10 transformed fungal data and raw ERMI-related measures [Sum of the Logs of Group 1 (SLG 1), Sum of the Logs of Group 2 (SLG 2), and ERMI] were evaluated for the presence of outliers and approximation to the normal distribution using the Scout data analysis program (US EPA, 2008), and for homogeneity of variance using Levene's test in R (R Development Core and Team, 2011), prior to analyses of mean group differences. Descriptive statistics were computed using the censored Maximum Likelihood Estimation (MLE) and bootstrap resampling with replacement procedures in the R package fitdistrplus (Delignette-Muller et al., 2010).

The populations of each of the 36 ERMI species in the 10 inspection-classified “Moldy” homes were compared to those of the 10 classified as “Non-Moldy” using the censored MLE *t*-test equivalent in the R package NADA (Lee, 2010) and verified using that package's equivalent of the nonparametric Peto and Peto modification of the Gehan-Wilcoxon test. Based on an apparent discrepancy between the inspection-classification status and the ERMI scores for two of the French homes originally assigned to the “Non-Moldy” group, these two homes were re-classified as “Uncertain” and the data re-analyzed as above using the censored MLE equivalents of the 3-group ANOVA and 2-group (*t*-test) contrasts. *p*-Values were adjusted for multiple comparisons following the two-stage Benjamini and Hochberg (1995) step-up procedure in the multtest package (Pollard et al., 2010) running under R, and results for all

comparisons were confirmed using the nonparametric Peto and Peto as described above. All estimates and analyses were carried out separately for dust and air samples.

Correlations between log10 dust and air values were evaluated based on the Pearson Correlation Coefficients computed as part of the parametric Ordinary Least Squares (OLS) censored regression procedure in the Scout software program (US EPA, 2008). Results were checked using the nonparametric Kendall tau procedure in the R package NADA (Lee, 2010).

To evaluate the application of the ERMI scale in French homes, each of the French homes was paired with a single, corresponding US home from the National Survey of 1083 continental US homes (Vesper et al., 2007) using the ERMI value closest to the French ERMI value. Nineteen of the 20 matched-pairs ERMI values were within ± 0.17 units of one another on the ERMI scale. The highest ERMI value among the French homes, 28.79, was paired with the closest US ERMI value of 27.02, a difference of 1.77 units. Differences between group log10 means were analyzed using the parametric censored MLE version of the paired *t*-test in the R package survival (Therneau and Lumley, 2011), and confirmed using the nonparametric equivalent implemented in that package. Both parametric analyses and nonparametric checks were carried out initially using all 20 French-US home pairs, and the results confirmed by parallel analyses omitting the pair with the outlying ERMI difference.

Results

The bootstrap estimates of average log10 concentration for each of the 36 fungi in French ($n=20$) and US ($n=1083$) homes and results of statistical analyses are presented in Table 2. Very few ERMI species concentrations were found to be greater in US homes than in French homes (e.g. *Aspergillus penicillioides*, *Epicoecum nigrum*), and none of these US > French home differences reached statistical significance. In contrast, 22 species were found in significantly greater concentrations in these French homes (e.g. *Aspergillus restrictus*, *Wallemia sebi*, etc.) relative to those in the US.

Since the number of French homes was very small compared to the number of homes in the US data set, each of the French homes was matched to a US home with the same or closest ERMI value (generally <0.17 ERMI units), and the species-specific and ERMI-related metrics were compared. There were 15 Group 1 fungi that were statistically different in the ERMI-paired US and French homes and 5 Group 2 fungi (Table 3). About half of these Group 1 fungi (9/15) were more abundant in French homes than US but all five of the Group 2 fungi were more common in these French homes. The Sum of the Logs of the Group 1 species was comparable in US and French homes. However, the Sum of the Logs of the Group 2 fungi was significantly greater in French homes.

The ERMI values for each of the French homes are shown in Fig. 1 along with their visual/olfactory-based classification as to “Moldy” and “Non-Moldy”. The ERMI values of homes 8 and 14 appear to be nearer the “Moldy” homes' ERMI values. (These two homes were resampled and the repeat ERMI values were comparable to the original ERMI values.) Therefore, the visual/olfactory classification of the homes was compared to the ERMI classification based on Maximum Likelihood Estimation (MLE) group differences analysis (Table 4). There were three categories “Moldy” ($n=10$), “Non-Moldy” ($n=8$) and “Uncertain” ($n=2$). This comparison was completed for both the dust and air samples.

The MLE group differences analysis demonstrated that the ERMI values for the ten “Moldy” homes were significantly different from the eight “Non-Moldy” homes but that the two “Uncertain” homes were not different from the ten “Moldy” homes. However, the ERMI values for the two “Uncertain” homes were significantly different from the eight “Non-Moldy” homes. Therefore the two “Uncertain”

Table 2
Comparison of the average log10 concentrations of ERMI species in French homes (*n* = 20) and United States homes (*n* = 1083) dust samples. Significant differences are flagged in bold type.

Fungus	Average log10 concentration cells/mg dust France	Average log10 concentration cells/mg dust United States	χ^2	p-Value
Group 1				
<i>Aspergillus flavus</i>	−0.0029	−0.4737	0.02	0.9
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.9520	0.2442	13.03	0.0003
<i>Aspergillus niger</i>	0.8497	0.3689	5.88	0.015
<i>Aspergillus ochraceus</i>	.02175	−1.0679	4.36	0.037
<i>Aspergillus penicilliioides</i>	1.4116	1.8766	2.31	0.13
<i>Aspergillus restrictus</i>	3.3448	−3.8588	89.75	<0.0001
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	−0.9484	−0.7155	0.44	0.51
<i>Aspergillus sydowii</i>	−0.9836	−1.0947	1.24	0.26
<i>Aspergillus unguis</i>	−0.5942	−1.3549	0.22	0.64
<i>Aspergillus versicolor</i>	1.2932	−0.9182	27.29	<0.0001
<i>Aureobasidium pullulans</i>	3.6318	2.4103	28.89	<0.0001
<i>Chaetomium globosum</i>	0.3631	−0.0404	3.43	0.064
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1.6995	1.0266	7.95	0.0048
<i>Eurotium group</i>	1.8888	2.1777	1.74	0.19
<i>Paecilomyces variotii</i>	−0.2112	−0.1482	2.95	0.086
<i>Penicillium brevicompactum</i>	2.8924	0.1293	57.47	<0.0001
<i>Penicillium corylophilum</i>	0.7639	−2.1491	23.55	<0.0001
<i>Penicillium crustosum</i>	2.2516	−4.4096	93.46	<0.0001
<i>Penicillium purpurogenum</i>	− 0.0305	−0.9261	17.05	<0.0001
<i>Penicillium spinulosum</i>	0.3920	−1.0114	22.52	<0.0001
<i>Penicillium variable</i>	−0.1404	0.0771	1.05	0.31
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	0.3280	0.0319	1.42	0.23
<i>Scopulariopsis chartarum</i>	1.0631	−0.2679	51.46	<0.0001
<i>Stachybotrys chartarum</i>	0.5837	−0.6000	9.15	0.0025
<i>Trichoderma viride</i>	1.3228	−0.2731	79.08	<0.0001
<i>Wallemia sebi</i>	3.5672	1.0716	72.04	<0.0001
Group 2				
<i>Acremonium strictum</i>	0.3618	0.3081	0.01	0.92
<i>Alternaria alternata</i>	1.5724	1.5074	0.1	0.75
<i>Aspergillus ustus</i>	−0.8930	−0.2626	0.15	0.7
<i>Cladosporium cladosporioides</i> type 1	3.5424	2.5289	31.61	<0.0001
<i>Cladosporium cladosporioides</i> type 2	1.7756	0.4489	41.29	<0.0001
<i>Cladosporium herbarum</i>	3.2549	1.3839	42.1	<0.0001
<i>Epicoccum nigrum</i>	1.8978	2.0482	0.29	0.59
<i>Mucor amphibiorum</i>	1.7293	1.1645	8.28	0.004
<i>Penicillium chrysogenum</i> type 2	2.2639	0.4799	46.79	<0.0001
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0.4771	−0.4986	25.65	<0.0001

Table 3
Comparison of the average concentrations of ERMI species (log10) and ERMI-related metrics in US and French homes when matched by comparable ERMI values. The higher concentration is bolded for each species under the French or United States column.

Fungus	Average log10 concentration cells/mg dust France	Average log10 concentration cells/mg dust United States	χ^2	p-Value
Group 1				
<i>Aspergillus penicilliioides</i>	1.4116	3.3462	28.44	<0.0001
<i>Aspergillus restrictus</i>	3.3448	−2.4873	31.69	<0.0001
<i>Aspergillus sydowii</i>	−0.9836	0.7869	10.6	0.0011
<i>Aspergillus unguis</i>	−0.5942	0.4171	11.02	<0.0001
<i>Aureobasidium pullulans</i>	3.6318	2.3335	25.65	<0.0001
<i>Eurotium group</i>	1.8888	2.8114	6.74	0.0094
<i>Paecilomyces variotii</i>	−0.2112	0.6630	15.16	<0.0001
<i>Penicillium brevicompactum</i>	2.8924	0.9360	19.35	<0.0001
<i>Penicillium corylophilum</i>	0.7639	−0.8178	6.48	0.011
<i>Penicillium crustosum</i>	2.2516	−1.3009	65.77	<0.0001
<i>Penicillium spinulosum</i>	0.3920	−0.2246	5.99	0.014
<i>Penicillium variable</i>	−0.1404	0.5920	3.9	0.048
<i>Scopulariopsis chartarum</i>	1.0631	0.1327	11	0.0009
<i>Trichoderma viride</i>	1.3228	0.0156	26.95	<0.0001
<i>Wallemia sebi</i>	3.5672	2.1589	13.16	0.0003
Group 2				
<i>Cladosporium cladosporioides</i> type 1	3.5424	2.6874	14.54	0.0001
<i>Cladosporium cladosporioides</i> type 2	1.7756	0.8260	21.56	<0.0001
<i>Cladosporium herbarum</i>	3.2549	1.6393	22.94	<0.0001
<i>Penicillium chrysogenum</i> type 2	2.2639	1.3407	7.93	0.0049
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0.4771	−0.1674	6.96	0.0083
Sum of the Logs (Group 1)	31.0095	26.1484	3.17	0.075
Sum of the Logs (Group 2)	17.5445	12.6818	10.61	0.0011
ERMI (Group 1 – Group 2)	13.4995	13.4929	0	0.97

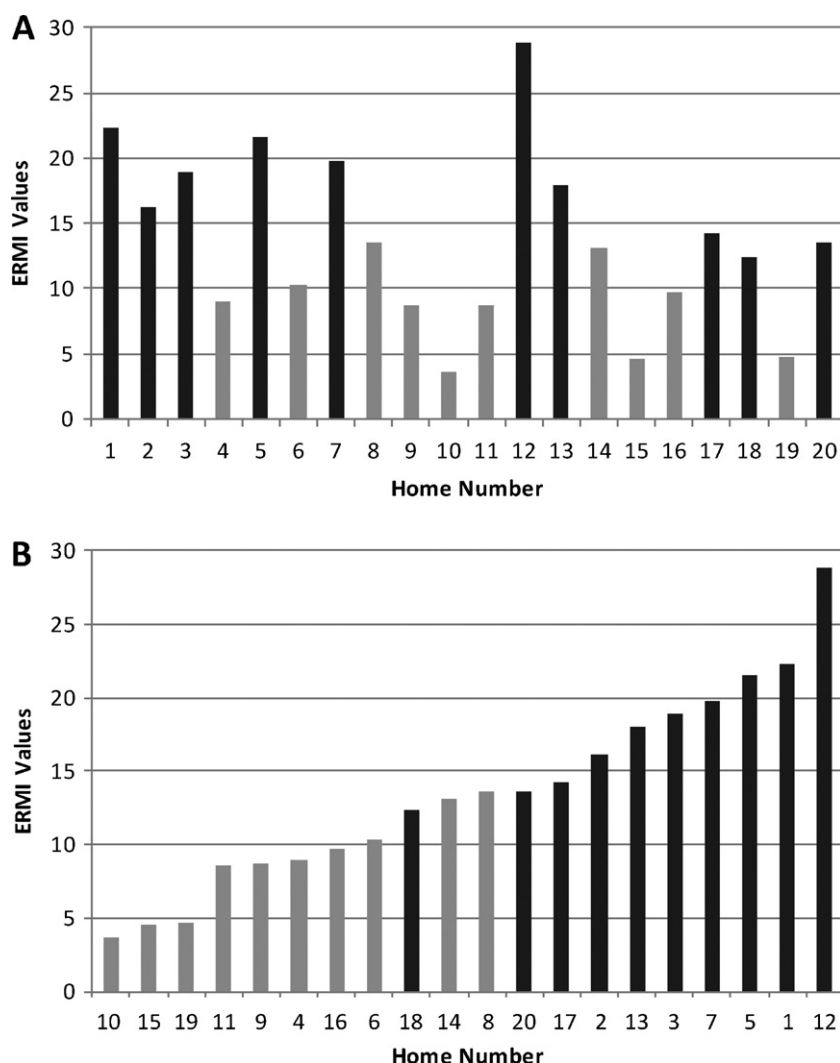


Fig. 1. (A) ERMI values for the 20 French homes and their visually/olfactory classification into “Moldy” and “Non-Moldy” categories. (B) ERMI values assembled from lowest to highest. Black bars are homes classified by inspection as “Moldy” and the gray bars were homes classified as “Non-Moldy”.

Table 4

Comparison of average ERMI-related values computed from air and dust samples in French homes. Based on an apparent discrepancy between the inspection-classification status and the ERMI scores for two of the French homes originally assigned to the “Non-Moldy” group, these two homes were re-classified as “Uncertain” and the data re-analyzed using the censored Maximum Likelihood Estimation equivalents of the 3-categories ANOVA and 2-categories (*t*-test) contrasts. *p*-Values were adjusted for multiple comparisons following the two-stage Benjamini and Hochberg (1995) step-up procedure and results for all comparisons were confirmed using the nonparametric Peto and Peto, as described in materials and methods. Contrast *p*-values with statistically significant differences are shown in bold.

Dust samples	Sum Group 1		Sum Group 2		ERMI	
	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>p</i>
Three-categories ANOVA						
10 “Mold” vs. 8 “non-Moldy” vs. 2 “Uncertain”	18.32	<0.001	3.8	0.15	22.48	<0.001
<i>t</i> -Test						
10 “Mold” vs. 8 “non-Moldy”	16.41	<0.001	2.85	0.24	20.23	<0.001
10 “Mold” vs. 2 “Uncertain”	2.35	0.31	1.33	0.51	2.27	0.32
8 “non-Moldy” vs. 2 “Uncertain”	6.13	0.047	0.09	0.96	7.69	0.021
Air samples	Sum Group 1		Sum Group 2		ERMI-like	
	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>p</i>
Three-categories ANOVA						
10 “Mold” vs. 8 “non-Moldy” vs. 2 “Uncertain”	6.53	0.027	0.63	0.57	7.21	0.022
<i>t</i> -Test						
10 “Mold” vs. 8 “non-Moldy”	6.8	0.099	0.87	0.65	7.37	0.025
10 “Mold” vs. 2 “Uncertain”	0.59	0.74	0.01	1	0.98	0.61
8 “non-Moldy” vs. 2 “Uncertain”	1.92	0.38	1.55	0.46	0.76	0.68

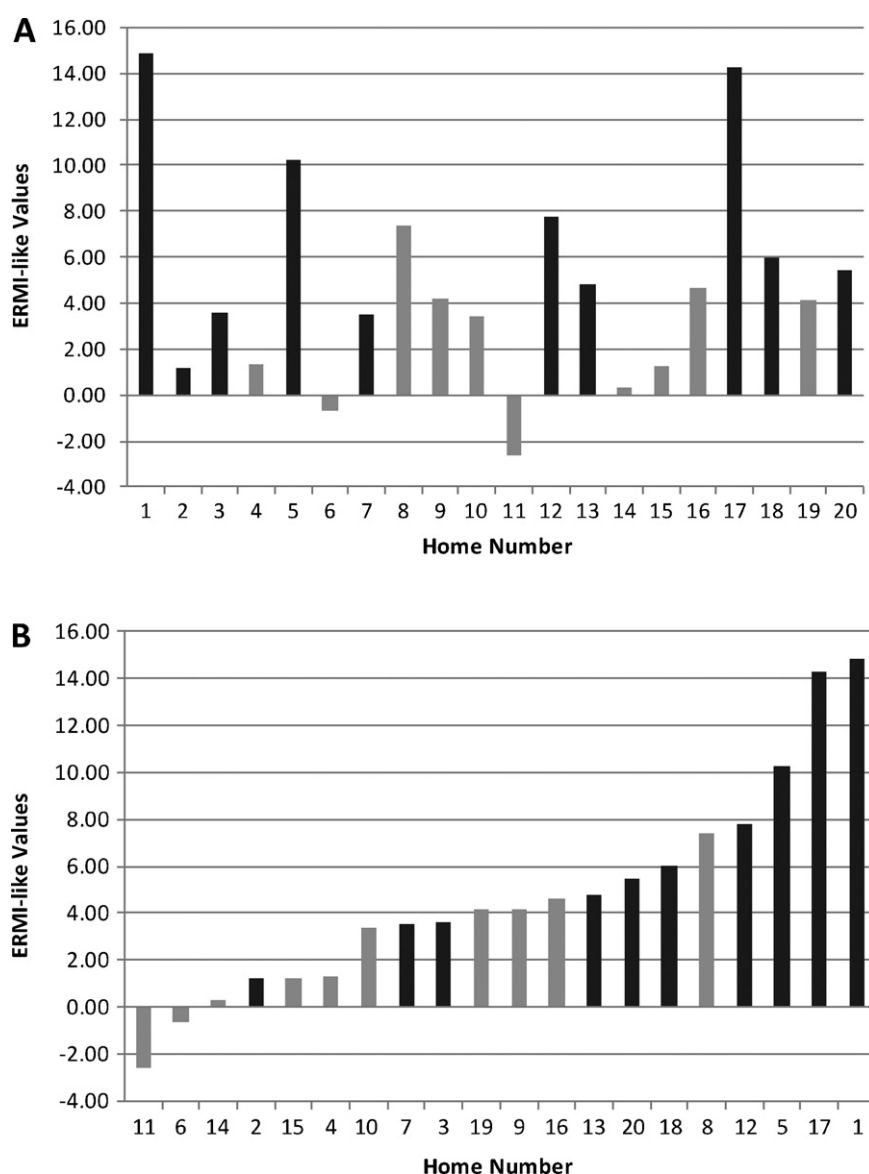


Fig. 2. (A) ERMI-like values (based on air samples) for the 20 French homes and their visually/olfactory classification into “Moldy” and “Non-Moldy” categories. (B) ERMI-like values (based on air samples) assembled from lowest to highest. Black bars are homes classified by inspection as “Moldy” and the gray bars were homes classified as “Non-Moldy”.

are reclassified as “Moldy”. As a result of this reclassification, the homes were re-inspected, and dust was again sampled. The ERMI values obtained for the first and second visits were similar (data not shown). It is possible that the molds in home 8 could be related to water damage in the bathroom that occurred 14 months before and the molds in home 14 could be related to the wooden floor frequently washed. These differences in the ERMI values were driven by the differences in the Sum of the Group 1 fungi, since the Sum of the Group 2 fungi were not significantly different (Table 4).

Although a true ERMI analysis (based on 5 mg of dust) cannot be completed on air samples, an ERMI-like analysis was completed on the air samples (Table 4). This analysis also demonstrated that the ten ERMI-like values in “Moldy” homes were significantly different from the ones obtained for eight “Non-Moldy” homes. Therefore the relationship between the concentrations of the fungi in the dust and air samples was investigated.

Pearson correlation analysis showed that the populations of five Group 1 fungi and two Group 2 fungi were significantly correlated in the 20 dust and air samples (Table 5). The Sum of the Logs of the

Group 1 fungi were also correlated but not the Sum of the Logs of the Group 2 fungi. The ERMI or ERMI-like values were also correlated in the dust and air samples. In many cases the ERMI-like values, based on the air samples, also agreed with the inspection classification. However, there were some notable exceptions, including homes 2, 3 and 7 (Fig. 2A and B).

Table 5

Pearson correlation between dust and air samples from 20 French homes.

Fungus	Pearson correlation	F	p
<i>Aspergillus restrictus</i>	0.616	10.99	0.004
<i>Chaetomium globosum</i>	0.611	10.7	0.004
<i>Eurotium</i> group	0.757	24.19	<0.001
<i>Penicillium corylophilum</i>	0.448	4.508	0.048
<i>Penicillium purpurogenum</i>	0.67	14.64	0.001
<i>Acremonium strictum</i>	0.599	10.06	0.005
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0.506	6.206	0.023
Sum of Group 1	0.553	7.933	0.011
Sum of Group 2	0.363	2.731	0.116
ERMI vs. ERMI-like	0.507	6.241	0.022

Discussion

Mold inspectors tend to classify homes as either “Moldy” or “Non-Moldy.” This is an over simplification. The contamination of homes would be better expressed on a continuum from low to high based on the populations of fungi. The ERMI scale provides this type of continuum; built with a random national selection of US homes. The ERMI values from the 20 French homes can be looked at as a continuum relative to each other.

When the ERMI values in these homes were assembled from lowest to highest, then compared to the inspection classification, the homes on either the left side or the right of the scale were in agreement with inspection (Fig. 1B). Two homes (8 and 14) classified by inspection as “Non-Moldy” had ERMI values in between two homes inspector-classified as “Moldy”. By examining the populations of fungi in these two homes, we determined that these homes fit better into the “Moldy” category. Therefore, the water damage and fungal growth may have been hidden in these two homes. This often happens when a water problem is corrected but the damaged materials are not removed. These materials provide a continuing reservoir of fungal contamination in the home even after the moisture is gone.

It might be more accurate to think of the homes 8 and 14 and by extension, 17, 18 and 20, as a “Middle-Moldiness” category. If there is a demarcation between Moldy and Non-Moldy, it may depend on the question being considered. For example, ERMI values in US infant homes above five were predictive of the development of asthma (Reponen et al., 2011). Use of the ERMI provides a more quantitative approach to describing contamination than traditional methods like counting and culturing (Vesper, 2011), since it utilizes a standard sampling procedure and DNA-based analysis which provides accurate identification and quantification of the fungi (Haugland et al., 2004).

About half of the fungi were in similar concentrations in US and in our sample of French homes but the others were split; sometimes a particular fungus was more common in France (especially some of the Group 2 fungi) and others in the US. Even so, the 90% agreement between ERMI values and inspection-classification of these French homes suggested that most of the 36 fungi may be adequate in creating an ERMI scale for France. However, since only 20 homes in Brittany were studied, we recognize this assessment of the 36 fungi remains to be established in different regions of the country.

Five of the Group 1 and two of the Group 2 fungi were highly correlated in the dust and air samples. Even though the ERMI is by definition based on a dust sample, we calculated for the first time an “ERMI-like” value for the air samples. The result was a significant correlation between the ERMI and ERMI-like results. Some of the differences between ERMI and ERMI-like estimations of contamination may be that the air samples were collected in the living room but dust samples were collected in both the living room and bedroom. When the ERMI-like values in these homes were assembled from lowest to highest, then compared to the inspection classification, the homes were globally in agreement with inspection (Fig. 2B). Some fungal species were found to be correlated in dust and air samples (Table 5). Although air sampling is a common technique to characterize the respiratory exposure of the inhabitants, spatio-temporal variations are one of the limitations of this approach. In contrast, accumulated dust in the home can be used to assess long-term bioaerosol exposure. Cautiously, we suggest that the ERMI-like values in air samples provide additional support to the use of these 36 fungi to describe fungal contamination in French homes based on the ERMI.

The ERMI scale has been applied to other countries besides the US including, the UK (Vesper et al., 2005) and Singapore (Yap et al., 2009). In these countries, the 26 Group 1 fungi had a common occurrence not unlike the US. However, the Group 2 species were

more variable than in US homes. For example, in the tropical climate of Singapore many of the *Cladosporium* species were found in lower concentrations than typically found in the US. (However, in Singapore, the samples came from shopping centers and not homes.)

In France, based on this limited sample of homes, some of the Group 2 fungi might be more abundant compared to the US. This might be due to windows being more commonly open for ventilation in French homes compared to the US which rely more on air-conditioning (Vandentorren et al., 2006). About half of the residential building stock in France was built before 1967, i.e. before the first regulations in 1969 requiring whole-house ventilation. Approximately, 70% of the dwellings have mechanical ventilation (35%) or natural ventilation (34.5%) installed but 21.5% have no ventilation system (Dimitroulopoulou, 2012). Therefore we cannot expect that the ERMI scale in France will be the same as in the US.

There have been previous attempts to create a metric for defining fungal contamination in French homes using air samples and culture-based quantification (Table 1). There are several problems with this approach: only viable fungi will grow, the media utilized will select for certain fungi, samples can only be taken for a limited time or the culture plates become over-crowded, and significant experience is required to identify the many different fungi. Realizing these limitations, a strategy based on QPCR testing five fungi was evaluated in eastern part of France (Bellanger et al., 2009). In this study, the sampling procedure utilized were relatively short air samples, i.e. 100 L over 33 min, and surface swab samples. In spite of the low levels of fungal detection, *Cladosporium sphaerospermum* and *Aspergillus versicolor*, two of the ERMI Group 1 fungi, were shown to be in higher concentrations in moisture-damaged homes compared to control homes. Therefore including 36 fungi in the analysis of dust samples should produce an even more robust assessment. Besides, these 36 fungal indicators seem representative of the biodiversity found in many French studies (Table 1).

The Mold Specific QPCR technology is fairly expensive, especially when compared to some of the traditional approaches to mold analysis (Vesper, 2011). However, the price of this analysis will decrease with the development of automated solution (nucleic acid extraction and PCR analysis). Besides, the ERMI analysis is a fast standardized method that provides an understandable exposure scale for inhabitants. However, many needs remain in creating a French ERMI.

The most urgent need is to sample a larger number of homes as only 20 homes were tested in the current study. The ERMI scale in the US tested approximately 1100 homes for a population of 310 million people. In France with a population of 65 million, one might estimate that about 20% as many or 220 homes would need to be sampled. The additional problem with our study was that it represented homes in one small geographic area. What is needed is a random national sampling of homes to create a French ERMI. Then, a French ERMI would be of special interest to study the impact of molds on respiratory health during chronic pulmonary diseases and to monitor the efficacy of preventive strategies.

In conclusion, the creation of the ERMI scale for US homes was based on a random national sampling of homes which was designed to represent the entire spectrum of US housing conditions. A similar random sampling and analysis of French housing is needed to create a similar scale for France. However, our results suggest that most of the fungi from the US ERMI panel might be sufficient as a starting place to create the index and that an ERMI-like index could also be applied on air samples.

Acknowledgements

Delphine Méheust's fellowship as well as home visits were funded by French School of Public Health.

Notice: The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) through its Office of Research and Development, partially funded and collaborated in the research described here. It has been subjected to the Agency's peer review and has been approved as an EPA publication. Mention of trade names or commercial products does not constitute endorsement or recommendation by the EPA for use. Commercial use of the ERMI technology can provide royalties to the EPA.

References

- Bellanger, A.P., Reboux, G., Roussel, S., Grenouillet, F., Didier-Scherer, E., Dalphin, J.C., Millon, L., 2009. Indoor fungal contamination of moisture-damaged and allergic patient housing analyzed using real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 260–266.
- Bellanger, A.P., Reboux, G., Scherer, E., Vacheyrou, M., Millon, L., 2012. Contribution of a cyclonic-based liquid air collector for detecting *Aspergillus fumigatus* by QPCR in air samples. *J. Occup. Environ. Hyg.* 9, D7–D11.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B* 57, 289–300.
- Boutin-Forzano, S., Charpin-Kadouch, C., Chabbi, S., Bennedjai, N., Dumon, H., Charpin, D., 2004. Wall relative humidity: a simple and reliable index for predicting *Stachybotrys chartarum* infestation in dwellings. *Indoor Air* 14, 196–199.
- Dassonville, C., Demattei, C., Detaint, B., Barral, S., Bex-Capelle, V., Momas, I., 2008. Assessment and predictors determination of indoor airborne fungal concentrations in Paris newborn babies' homes. *Environ. Res.* 108, 80–85.
- Delignette-Muller, M.L., Pouillot, R., Denis, J.-B., Dutang, C., 2010. Fitdistrplus: Help to Fit of a Parametric Distribution to Non-Censored or Censored Data. R Package Version 0.1-2.
- Dimitroulopoulou, C., 2012. Ventilation in European dwellings: a review. *Build. Environ.* 47, 109–125.
- Haugland, R., Vesper, S., 2002. Identification and quantification of specific fungi and bacteria. Patent 6,387,652 Granted May 14, 2002.
- Haugland, R.A., Brinkman, N.E., Vesper, S.J., 2002. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungal cells using real time PCR analysis. *J. Microbiol. Meth.* 50, 319–323.
- Haugland, R.A., Varma, M., Wymer, L.J., Vesper, S.J., 2004. Quantitative PCR of selected *Aspergillus Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 198–210.
- Institute of Medicine (IOM), 2004. National Academies of Science. Damp Indoor Spaces and Health. The National Academies Press, Washington, DC, 355 pp.
- Kercsmar, C.M., Dearborn, D.G., Schluchter, M.D., Xue, L., Kirchner, H.L., Sobolewski, J., Greenberg, S.J., Vesper, S.J., Allan, T., 2006. Reduction in asthma morbidity in children as a result of home remediation aimed at moisture sources. *Environ. Health. Perspect.* 114, 1574–1580.
- Lee, L., 2010. NADA: Nondetects and Data Analysis For Environmental Data. R Package Version 1.5-3.
- Pollard, K.S., Houston, K., Gilbert, H.N., Ge, Y., Taylor, S., Dudoit, S., 2010. Multtest: Resampling-Based Multiple Hypothesis Testing. R Package Version 2.8.0.
- R Development Core Team, 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Version 2.13.2.
- Reboux, G., Bellanger, A.P., Roussel, S., Grenouillet, F., Sornin, S., Piarroux, R., Dalphin, J.C., Millon, L., 2009. Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor Air* 19, 446–453.
- Reponen, T., Vesper, S., Levin, L., Johansson, E., Burkle, J., Ryan, P., Grinspun, S.A., Zheng, S., Bernstein, D.L., Lockey, J., Villareal, M., Khurana Hershey, G.K., LeMasters, G., 2011. High Environmental Relative Moldiness Index during infancy as predictor of age seven asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 107, 120–126.
- Therneau, T., Lumley, T., 2011. Survival Analysis, Including Penalized Likelihood. R Package Version 2.36-9.
- U.S. Environmental Protection Agency (US EPA), 2008. Scout Version 1.00.01, A Statistical Software Package for the Classical and Robust Analysis of Univariate and Multivariate Data Sets with and without Non-detect Observations. The Software Scout 1.00.01 can be freely downloaded from the E.S. EPA web site from: <http://www.epa.gov/nerlesd1/databases/scout/abstract.htm>.
- Vandentorren, S., Bretin, P., Zeghnoun, A., Mandereau-Bruno, L., Croisier, A., Cochet, C., Ribéron, J., Siberan, I., Declercq, B., Ledrans, M., 2006. August 2003 heat wave in France: risk factors for death of elderly people living at home. *Eur. J. Public Health* 16, 583–591.
- Vesper, S., 2011. Traditional mould analysis compared to a DNA-based method of mould analysis. *Crit. Rev. Microbiol.* 37, 15–24.
- Vesper, S.J., McKinstry, C., Haugland, R.A., Wymer, L., Ashley, P., Cox, D., DeWalt, G., Friedman, W., 2007. Development of an Environmental Relative Moldiness Index for homes in the U.S. *J. Occup. Environ. Med.* 49, 829–833.
- Vesper, S.J., Wymer, L.J., Meklin, T., Varma, M., Stott, R., Richardson, M., Haugland, R.A., 2005. Comparison of populations of mould species in homes in the UK and USA using Mold-Specific Quantitative PCR (MSQPCR). *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 367–373.
- WHO World Health Organization (WHO) Europe, 2009. WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Dampness and Mould. WHO, Copenhagen, Denmark.
- Yap, J., Toh, Z.A., Goh, V., Ng, L.C., Vesper, S., 2009. Assessment of mould concentrations in Singapore shopping centers using Mould Specific Quantitative PCR (MSQPCR) analysis. *Indian J. Microbiol.* 49, 290–293.

Chapitre 5. Mesure de l'exposition aux moisissures dans l'environnement domiciliaire : comparaison de différentes méthodes de prélèvements et d'analyses

Introduction

Un dégât des eaux ou un développement de moisissures peuvent potentiellement se produire dans tout type d'habitat. La perception des occupants est souvent utilisée dans les études épidémiologiques pour évaluer l'humidité des logements et la présence de moisissures visibles. Or la corrélation entre ce que reportent les questionnaires sur la croissance fongique et l'exposition réelle aux composés fongiques n'est pas connue (OMS 2009). De plus, la prévalence estimée peut varier fortement selon la formulation de la question, le type et le niveau de précision de la question, et l'opinion des occupants qui remplissent le questionnaire. Pour limiter les biais de subjectivité, les habitations peuvent être visitées par des enquêteurs formés afin d'évaluer la sévérité du problème d'humidité/moisissure (INSPQ 2008). Cette méthode utilisée dans de nombreuses études permet de standardiser l'approche ; cependant elle présente des limites pour décrire quantitativement et qualitativement la contamination fongique. Seules des mesures environnementales peuvent apporter une information plus objective.

De nombreuses méthodes ont été développées, néanmoins il est souvent difficile pour un enquêteur de choisir le bon outil pour diagnostiquer un problème de contamination fongique dans les logements. De plus, peu d'études ont comparé ces méthodes sur le terrain dans des conditions environnementales semblables. Au cours de cette thèse, différentes techniques de prélèvements et d'analyses ont été évaluées. Le travail présenté dans l'article 5 vise à étudier les corrélations entre les diverses approches pour mesurer la contamination fongique dans 40 logements. La même personne a estimé l'étendue des surfaces moisies et effectué des prélèvements d'air et de poussières dans ces habitats. Les principales caractéristiques des logements ont été reportées. Les échantillons environnementaux ont ensuite été analysés par la méthode culturale traditionnelle et par des outils moléculaires (Figure 9).

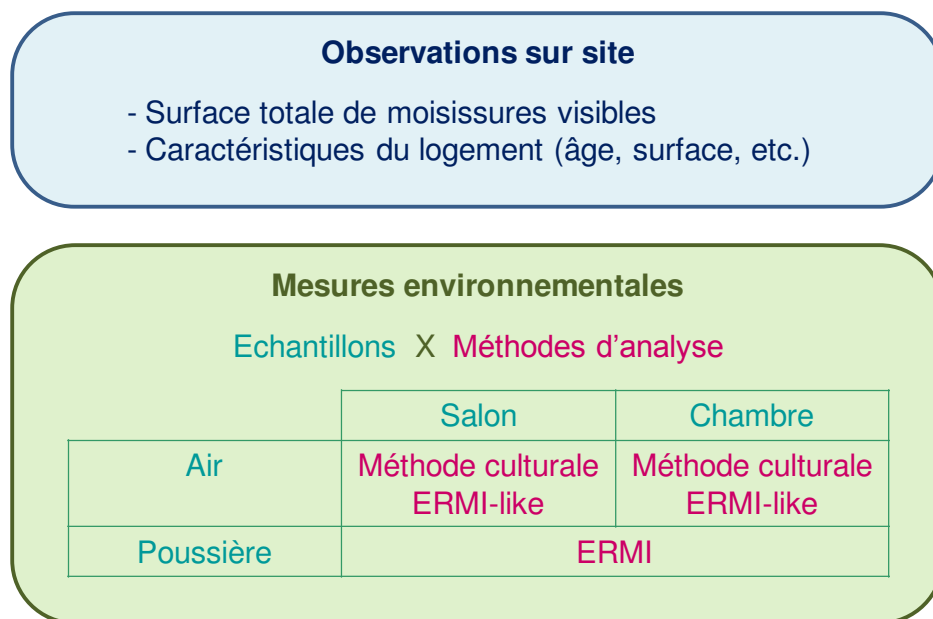


Figure 9. Comparaison de méthodes pour la mesure de la contamination fongique domiciliaire

Résultats et Discussion

Les valeurs ERMI obtenues dans les échantillons de poussières corrélaient significativement avec les valeurs ERMI-like et les concentrations en moisissures dans l'air déterminées par culture. Alors que les concentrations de moisissures cultivables corrélaient significativement entre les échantillons d'air prélevés dans le salon et dans une chambre, la corrélation n'était pas significative entre les deux pièces pour les valeurs ERMI-like. Il est néanmoins important de noter que les résultats obtenus, par la méthode culturale et l'indice moléculaire, relèvent d'une approche quantitative différente. En effet, pour déterminer la valeur de l'indice, les concentrations des groupes fongiques communs dans l'air extérieur sont soustraites aux concentrations des moisissures indicatrices de logements humides : ceci permet d'ajuster les différences liées au renouvellement de l'air intérieur et aux habitudes ménagères des familles (Vesper 2011). Les résultats obtenus par culture représentent la flore fongique cultivable dans sa globalité. Or celle-ci peut être influencée par la biocontamination provenant de l'extérieur et qui donc masquerait les différences de concentrations dans le logement.

Dans les 40 logements bretons visités dans cette étude, l'étendue des surfaces moisies estimée par l'enquêteur corrélait significativement avec toutes les mesures effectuées pour quantifier la contamination fongique. Cependant les inspecteurs ne sont pas toujours formés de la même façon et le développement fongique peut être caché dans les murs ou les systèmes de ventilation. Dans l'enquête effectuée par le Département du logement et du développement urbain des États-Unis, il est apparu que dans 50% des habitats ayant une

valeur ERMI supérieure à 5, ni les occupants, ni l'inspecteur n'ont détecté de moisissures. Dans une étude américaine menée dans 184 logements, aucune association n'avait été identifiée entre les moisissures visibles et les mesures microbiennes (Reponen et al. 2010). De même, un indice développé par des chercheurs du Centre Scientifique et Technique du Bâtiment a montré de fortes disparités avec les estimations de la contamination fongique visible dans 94 logements (Moularat et al. 2011). Il est important de noter que cet indice français basé sur la détection de COV fongiques spécifiques apporte une information qualitative sur la présence ou l'absence de contamination, alors que les outils qPCR décrivent qualitativement et quantitativement l'exposition fongique.

L'indice ERMI présente différents avantages par rapport aux autres méthodes de mesure. Un échantillon de poussière unique permet d'intégrer la variabilité spatio-temporelle de la contamination fongique, alors que les échantillons d'air reflètent l'aérobiocontamination au moment du prélèvement. De plus, la collecte des poussières peut être facilement et rapidement effectuée par les occupants suivant le protocole standardisé (Van Dyke et al. 2012). Des études précédentes ont montré que le tamisage de la poussière permet d'obtenir un échantillon homogène, et que l'analyse ERMI est reproductible (Reponen et al. 2012; Vesper, McKinstry, Haugland, Wymer, et al. 2007). Enfin, l'analyse qPCR peut être réalisée en moins de 48 heures, contrairement aux analyses par culture nécessitant plusieurs jours. Bien qu'un nombre limité de laboratoires réalisent cette analyse ERMI (notamment aux États-Unis et en Finlande), ce type de prestation pourrait être plus accessible en Europe dans les années à venir.

La pertinence de cet outil a récemment été soulignée par des études épidémiologiques. En effet, des associations entre l'exposition fongique mesurée par l'indice ERMI et certaines maladies respiratoires, telles que les rhinites et l'asthme, ont été mises en évidence (Reponen et al. 2011; Vesper, McKinstry, Haugland, Iossifova, et al. 2007). Ce type de mesure de la contamination fongique serait donc particulièrement intéressant pour les familles avec un historique d'asthme. Enfin, cette étude menée en Bretagne a objectivé que les habitats anciens avaient un risque plus important de contamination fongique. L'utilisation de l'outil ERMI, comme étape de diagnostic, pourrait alors contribuer à la mise en place d'actions visant à réduire l'exposition aux moisissures dans ces logements.



Correlation between Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) values in French dwellings and other measures of fungal contamination

Delphine Méheust^{a,b,*}, Jean-Pierre Gangneux^{a,c,d}, Tiina Reponen^e, Larry Wymer^f, Stephen Vesper^f, Pierre Le Cann^{a,b}

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U1085, Institut de Recherche Santé, Environnement & Travail (IRSET), F-35043 Rennes, France

^b Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP), F-35043 Rennes, France

^c Université de Rennes 1, Faculté de Médecine, F-35043 Rennes, France

^d Centre Hospitalier Universitaire de Rennes (CHU), Service de Parasitologie-Mycologie, F-35033 Rennes, France

^e University of Cincinnati, Department of Environmental Health, Cincinnati, OH 45267-0056, USA

^f Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268, USA

HIGHLIGHTS

- The average ERMI was 15.7 for high versus 2.7 for the low ERMI dwellings in France.
- ERMI values were correlated with concentrations of fungi in air samples.
- ERMI values were correlated with the visible estimates of fungal contamination.
- Older dwellings were more likely to fall into the high ERMI category.
- ERMI values can possibly substitute for other estimates of fungal contamination.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 May 2012

Received in revised form 28 August 2012

Accepted 29 August 2012

Available online xxxx

Keywords:

Fungi

ERMI

Dwelling

QPCR

Culture technique

France

ABSTRACT

The Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) is a DNA-based metric developed to describe the fungal contamination in US dwellings. Our goal was to determine if the ERMI values in dwellings in north western France were correlated with other measures of fungal contamination. Dust and air samples were obtained from 40 dwellings and analyzed by quantitative PCR and/or by culturing. These dwellings were also inspected and the amount of visible fungal growth estimated in m². The ERMI values in these dwellings ranged from −2.7 to 28.8 and the fungal contamination estimates ranged from 0 to 20 m². The 40 dwellings were divided into those with a low (<6) or high (>8) ERMI values (n = 20 in each). The average ERMI value was 15.70 for the high ERMI compared to 2.68 for the low ERMI dwellings. ERMI values were correlated (significant Kendall's tau values) with concentrations of fungi in air samples analyzed by QPCR or culturing. ERMI values were also correlated (significant Kendall's tau values) with the visible estimates of fungal contamination. Older dwellings were more likely to have higher ERMI values. These results suggest that the ERMI dust sample, which is quick and easy to collect, may be useful in making decisions about reducing fungal exposures in homes.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Asthma prevalence in France is about 9 to 10% for children and 6 to 7% for adults (Delmas et al., 2009, 2010). A review of the scientific literature indicated that asthma is associated with observed water-damage and fungal growth (World Health Organization (WHO) Europe, 2009). As we spent 80% of our time in more and more insulated buildings, with sometimes poor ventilation and high dampness, we may be exposed to high concentrations of molds (Reboux et al., 2010). In addition,

fungal infections are also on the rise (Bitar et al., 2009). Therefore quantitative metrics to describe the fungal contamination in dwellings are necessary to guide interventions and thereby to reduce fungal exposures (Vesper, 2011). In addition, any metric created should be simple to use and understand.

The Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) is a metric that was created to quantify fungal contamination in US dwellings (Vesper et al., 2007). Standardized 5.0 mg dust samples were analyzed using a DNA-based technology called quantitative PCR (QPCR) for 36 indicator fungi; 26 Group 1 species associated with water-damaged dwellings and 10 Group 2 species found in dwellings independent of water damage (Vesper et al., 2007). The ERMI was calculated by taking the sum of the logs of the concentrations of the Group 1 fungi and subtracting the sum of the logs of the concentrations of Group 2 fungi. The resulting

* Corresponding author at: INSERM U1085, Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique, Av. Pr Léon Bernard, CS 74312, 35043 Rennes Cedex, France. Tel.: +33 2 99 02 29 22; fax: +33 2 99 02 29 29.

E-mail address: Delphine.Meheust@ehesp.fr (D. Méheust).

ERMI scale in the US ranges from about –10 to 20 (even higher in about 1% of dwellings). The ERMI scale was divided into quartiles. An ERMI of approximately five is the demarcation between third quartile and the fourth or the “highest fungal contamination” quartile in the US. When the QPCR analysis of the 36 species was applied to air samples and the same calculation principle was used, an “ERMI-like” metric was created (the ERMI itself is only based on a dust sample). Previously, we used the ERMI and ERMI-like estimates to help categorize fungal contaminations in French dwellings (Méheust et al., 2012). Other studies that have utilized the QPCR method for characterizing indoor fungi have included limited set of fungal species (Bellanger et al., 2009; Kaarakainen et al., 2009; Lignell et al., 2008).

In this study, 36 indicator fungi were quantified by QPCR in environmental samples obtained from 40 dwellings in north western France (Brittany). We assessed whether ERMI values in dust samples were correlated with air samples quantified using QPCR or using culturing methods. Also assessed was the correlation between ERMI-based estimates of fungal contamination and those estimates derived from visual inspection.

2. Materials and methods

2.1. Dwelling selection and inspection

Forty dwellings in north western France (Brittany) were selected for the study. For 20 dwellings, investigation was requested following a complaint about problems of fungal growth and/or humidity, either registered at the Rennes city Department of Environmental Health, or at the Environment and Health Research Laboratory (LERES). The selection of control dwellings in the same geographic area was based upon ease of availability. Dwellings (22 apartments and 18 houses) with different ages (from the 17th century to 2011) and different sizes (from 17 to 300 m²) were thus recruited. Most of them were located in urban settings (28/40). Inspections were carried out by a trained investigator during the winters of 2010–2011 and 2011–2012; most dwellings were heated at this time in the Brittany region. Visible fungal growth area was estimated in m² and a questionnaire was filled about the characteristics of the living space. At least one inhabitant of the home was present during inspection, but there was no human activity and no device that might influence airborne particles in the room during sampling.

2.2. Air and dust sampling

The Coriolis cyclone collector (Bertin Technologies, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) was used at a flow rate of 300 L/min to collect two 10-min air samples: one in the living room and one in the bedroom of each of the 40 dwellings. The sampler was placed at a height of 1 m close to the sofa or bed, respectively. Airborne microorganisms were sampled in collection liquid (AES Chemunex, Bruz, France) with an initial volume of 15 mL. For the QPCR analysis, an aliquot of 1.5 mL of the sample was centrifuged at 5000 × g for 15 min and the supernatant fluid was removed to keep the pellet in 100 µL.

Dust samples were then collected from 40 dwellings by vacuuming 2 m² in the living room and 2 m² in a bedroom for 5 min each with a Mitest™ sampler-fitted vacuum, directly adjacent to the sofa or bed, respectively. One composite dust sample was collected from each home. Same protocol was used for hard surface floors (n = 35) and for carpeted floors (n = 5). This is the standard protocol developed by EPA. The dust was sieved through a 300 µm pore size mesh to remove large particles and other objects. The dust and air samples were stored at –20 °C until analyzed by QPCR.

2.3. Fungal identification and quantification using QPCR

Both an aliquot of 5.0 ± 0.1 mg of the dust and the centrifuged pellets of the two air samples were analyzed for each dwelling. The

samples were spiked with 1 × 10⁶ conidia of *Geotrichum candidum* as an external reference. Each extraction tube was shaken in the bead beater (Biospec Products, Bartlesville, OK) for 1 min and the DNA purified using the DNA-EZ extraction kit (GeneRite, Cherry Hill, NJ).

Methods and assays have been reported previously for performing QPCR analyses (Haugland et al., 2002, 2004). Briefly, the standard reaction assays contained 12.5 µL of “Universal Master Mix” (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 1 µL of a mixture of forward and reverse primers at 25 µM each, 2.5 µL of a 400 nM TaqMan probe (Applied Biosystems Inc.), 2.5 µL of 2 mg/ml fraction V bovine serum albumin (Sigma Chemical, St. Louis, MO) and 2.5 µL of DNA free water (Cepheid, Sunnyvale, CA). To this mix was added 5 µL of the DNA extract from the sample. All primer and probe sequences used in the assays as well as known species comprising the assay groups are at the website: <http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>. Primers and probes were synthesized commercially (Applied Biosystems, Inc.).

Reactions were performed with thermal cycling conditions consisting of 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C for template denaturation and 1 min at 60 °C for probe and primer annealing and primer extension. The Cycle threshold determinations were automatically performed by the Roche 480 software (Roche, Penzberg, Germany) using the second derivative maximum method. Assays for each target species and the internal reference (*G. candidum*) were performed in separate tubes of the 96-well plate format.

2.4. Cultivation analysis of air samples

Coriolis samples were also plated on malt extract agar (MEA, Merck, Germany). The numbers of fungal colony forming units (CFU) per plate were determined on days 3 and 7 after incubation at 25 °C. The total fungal concentrations were adjusted with the total liquid volume after Coriolis sampling. Results for air samples were thus expressed as CFU per cubic meter of air sampled.

2.5. Statistical analyses

Associations between dust ERMI values and other measurements (ERMI-like values and concentrations of culturable fungi in living room and bedroom air samples, age of dwelling, size of the contaminated area, and size of the dwelling) were evaluated by means of the Kendall coefficient (“Kendall's tau”). Values for Kendall's tau were calculated by the ranking procedure described in Hollander and Wolfe (1973) and using Microsoft Excel 2007 to perform the data manipulation. Corresponding p-values were obtained from Table A.21 in Hollander and Wolfe (1973).

3. Results

The ERMI values in these dwellings ranged from –2.74 to 28.79 (Fig. 1). There was an obvious break in the assembled ERMI values (no six or seven value ERMIs) and so the dwellings were divided into low (<6) or high (>8) ERMI dwellings. The mean ERMI values were 2.68 for low vs. 15.70 for high ERMI dwellings and these means were significantly different (Table 1). The differences between Sum of the Logs of the Group 1 and Group 2 fungi were also significantly different in low vs. high ERMI dwellings (Table 1). Furthermore, significant differences were observed for most of the mean concentrations of individual species in low vs. high ERMI dwellings (data not shown).

The ERMI values and “ERMI-like” values based on air samples in the living room or bedroom were significantly correlated (concordance 71.9% with average living room plus bedroom) (Table 2). The ERMI-like values in these dwellings ranged from –2.58 to 17.06 in

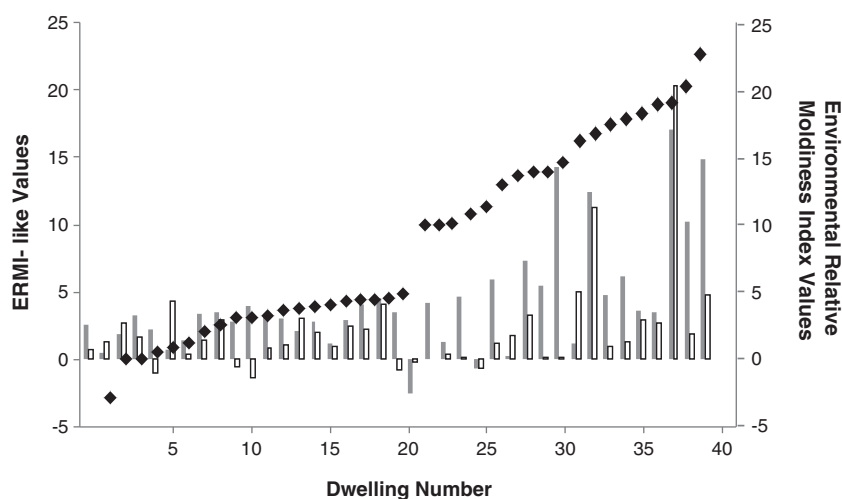


Fig. 1. Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) values for 40 dwellings in Brittany France assembled from lowest to highest (black diamonds—note that for home #40 the ERMI is 28.79 and is not shown). The ERMI-like values for the living room air samples (gray columns) and bedroom air samples (white columns) corresponding to the ERMI values for each dwelling are shown.

the living rooms and from -1.36 to 20.37 in the bedrooms (Fig. 1). In addition, the culture data from the Coriolis air samples (Fig. 2) were significantly correlated (concordance 67.0% with average living room plus bedroom) with the ERMI values in the living room and bedroom (Table 2).

The older the dwelling, the higher was the probability that the ERMI would be greater compared to younger dwellings ($p = 0.025$, Table 2) (Fig. 3). Also, the inspector's visual estimate of the area of mold contamination (Fig. 4) was significantly correlated (concordance 71.4%) with the ERMI values in these dwellings (Table 2). The age of dwelling and the area of mold contamination were also significantly correlated with the concentrations expressed as CFU per m^3 of air. However, there was no statistically significant relationship between size of the dwelling and the measures of fungal contamination. The concordance varied from 49.9 to 71.9% indicating that over 49% of the data pairs in each comparison had the same rank order. In most cases Kendall's tau was smaller than Pearson's correlation coefficient indicating that the relationship between the two variables tends to be linear.

4. Discussion

The ERMI is a continuous scale and was developed to provide meaning to the fungal concentrations in homes. It does not provide an absolute assessment but a relative assessment compared to a random national sampling of US homes. Previously we showed that the 26 “water-damage-indicator” Group 1 and 10 “outdoor” Group 2 fungi occurred in French homes (Méheust et al., 2012). The results obtained in this study, even with only 40 homes, suggest that the ERMI values measured in French dwellings are higher than measured in US dwellings (Vesper et al., 2007). By subtracting the Sum of the Logs of the Group 2 fungi from the Sum of the Logs of the Group 1

Table 1

Comparison of the means and standard deviations (STD) of the Sum of the Logs of the Group1 fungi, Sum of the Logs of the Group 2 fungi, and ERMI values in Brittany, France dwellings with ERMI values <6 ($n = 20$) and dwellings with ERMI values >8 ($n = 20$).

	ERMI <6 ($n = 20$)		ERMI >8 ($n = 20$)		Student's <i>t</i> -test p value
	Mean	STD	Mean	STD	
Sum of the Logs Group 1	9.99	5.81	31.64	7.92	<0.001
Sum of the Logs Group 2	7.31	4.75	15.93	5.16	<0.001
ERMI	2.68	2.07	15.70	5.36	<0.001

fungi, we can adjust for differences in locations, family habits, pet ownership etc. This approach is not used in cultivation results that could be more affected by the outdoor air masking the difference in indoor concentrations; this may contribute to the relatively low intra-home variation in cultivation results as shown in Fig. 2. In the 40 French dust samples, the concentrations of the Group 2 fungi were found to be significantly higher in homes with high ERMI values (Table 1). It was previously suggested that some of these common fungal species are more abundant in France compared to the US (Méheust et al., 2012). This might be due to windows being more commonly open in dwellings with dampness or mold problems, especially in older dwellings that usually don't have mechanical ventilation. The

Table 2

Statistical results for various comparisons of Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) and ERMI-like values based on the quantitative PCR analysis of air samples in the living room (LR) and bedroom (BR); the ERMI values and concentrations of total fungi in air samples quantified after culturing of malt extract agar expressed as colony forming units (CFU) per m^3 of air; and with the age of dwellings (in years).

Comparisons		P values	Kendall's tau	Concordance %	Pearson r value
ERMI vs.	ERMI-like LR	<0.001	0.438	71.9	0.595
	ERMI-like BR	0.028	0.212	60.6	0.366
	Average ERMI-like LR + BR	<0.001	0.438	71.9	0.546
ERMI vs.	CFU per m^3 LR	0.002	0.313	65.6	0.339
	CFU per m^3 BR	0.001	0.344	67.2	0.424
	Average CFU per m^3 LR + BR	0.001	0.340	67.0	0.403
ERMI-like LR vs.	ERMI-like BR	0.060	0.173	58.7	0.595
CFU per m^3 LR vs.	CFU per m^3 BR	<0.001	0.692	84.6	0.766
ERMI-like LR vs.	CFU per m^3 LR	0.001	0.364	68.2	0.698
ERMI-like BR vs.	CFU per m^3 BR	0.014	0.241	62.1	0.613
Contamination (m^2) vs.	ERMI	<0.001	0.428	71.4	0.522
	ERMI-like LR	<0.001	0.426	71.3	0.362
	ERMI-like BR	0.009	0.260	63.0	0.464
	CFU per m^3 LR	<0.001	0.392	69.6	0.389
Age of dwelling vs.	CFU per m^3 BR	<0.001	0.469	73.5	0.537
	ERMI	0.025	0.217	60.8	0.293
	ERMI-like LR	0.001	0.350	67.5	0.461
	ERMI-like BR	0.093	0.147	57.4	0.381
	CFU per m^3 LR	0.001	0.326	66.3	0.593
	CFU per m^3 BR	0.001	0.382	69.1	0.789

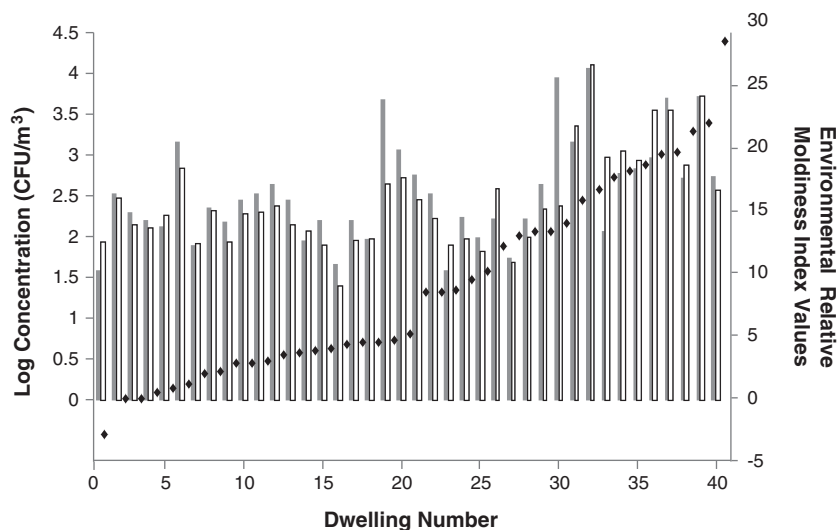


Fig. 2. Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) values for 40 dwellings in Brittany France assembled from lowest to highest (black diamonds). The logs of the total fungal cell concentrations as colony forming units (CFUs) per m³ of air sampled from the living room (gray columns) and bedrooms (white columns) are shown corresponding to the ERMI values for each dwelling.

role of the Group 2 molds in the ERMI calculation provides adjustments primarily for differences in the cleaning habits of the occupants. In general, if a family is very particular about the cleanliness of their home, they are also more likely to be very particular about the maintenance of that home. Therefore a very clean home, that is low Group 2 molds, is also more likely to have a lower overall ERMI because the home is well maintained and therefore less likely to have water problems. However, our study included a relatively small number of homes and in only one area of France. It will be interesting to see if this situation is found more widely in France.

The inspector's estimates of contamination were generally low when the homes had lower ERMI values and high in higher ERMI value homes. In some rare exceptions, low ERMI values were found in homes with visible mold contamination (eg. home #6 where water damage occurred on another floor two months before inspection). The ERMI is thus not a standalone tool and inspection is also important to describe mold burden. By combining the sampling of the living room and bedroom dust into a single ERMI sample, a larger volume of the home can nevertheless be analyzed. This reduces the

time for collecting air samples and costs of obtaining and analyzing separate samples in different rooms. However, if one is trying to locate the source of the fungal contamination, it might be useful to sample multiple locations in the home separately. For example, the ERMI metric allowed the detection of hidden damages in the home #28, where water damage in a bathroom occurred 14 months before. Contrary to a fungal index that was recently created in France (Moularat et al., 2008), ERMI values were globally in agreement with visible estimates of fungal contamination. This fungal index, based on the presence or absence of specific microbial volatile organic compounds (MVOCs), was indeed not predictive of other estimates of fungal contamination, including visual inspection (Moularat et al., 2011). Since fungal contamination occurs in every dwelling at some level, an exposure scale, like the ERMI, which is a continuum from low to high may more closely approximate exposure doses compared to a categorical (positive /negative) scale like fungal index.

In addition, the ERMI values had a good correlation with fungal contamination estimates from the Coriolis samples, analyzed by QPCR or culturing. As the dust sample is collected in the bedroom

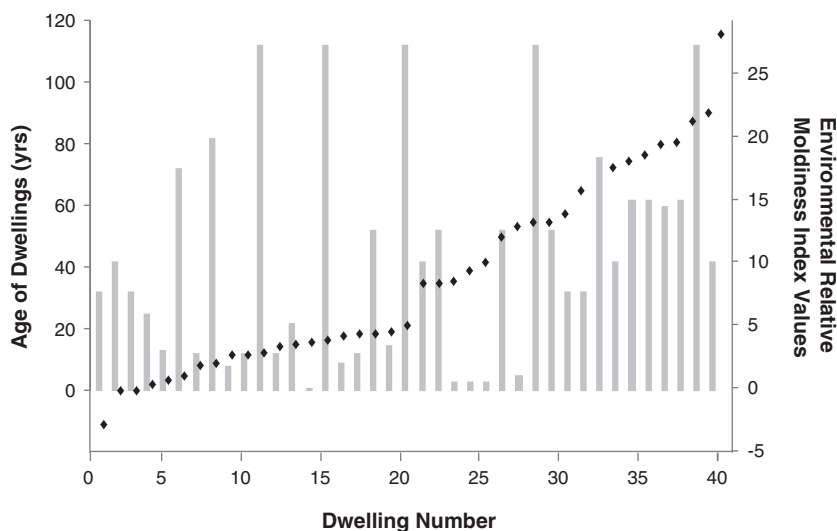


Fig. 3. Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) values for 39 dwellings (dwelling from 1700 not shown on graph) in Brittany France assembled from lowest to highest (black diamonds) and the corresponding ages in years of each dwelling (gray columns).

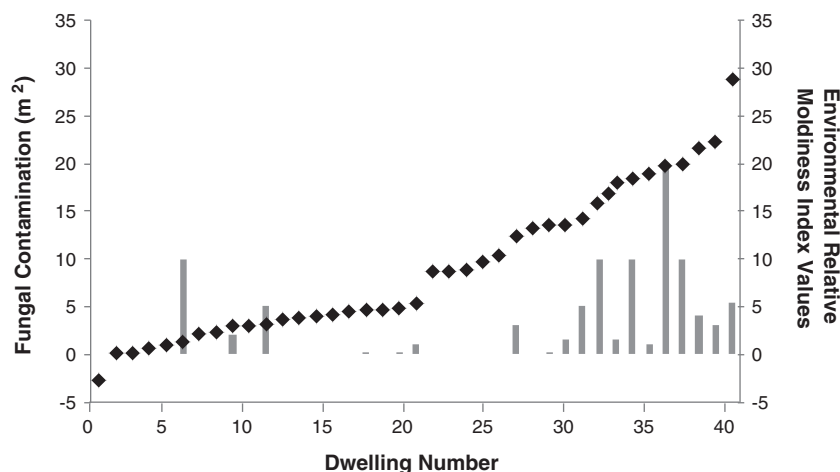


Fig. 4. Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) values for 40 dwellings in Brittany France assembled from lowest to highest (black diamonds) and the corresponding visual estimates of fungal contamination (gray columns).

and in the living-room, the spatio-temporal variability of the fungal exposure is integrated in a unique sample, in comparison to the air samples that reflect the contamination at the time of sampling. Besides, residents can reliably follow directions and collect settled dust samples in homes in about 15 min (Van Dyke et al., 2012). By sieving the dust in a defined way, one uniform sample is obtained. It was indeed shown that the Pearson correlation between ERMI values for 435 duplicates of the same dust samples, as determined by the EPA laboratory and by a commercial laboratory, was 0.734 (Vesper et al., 2007). Furthermore, the reproducibility of the entire ERMI measurement was assessed by analyzing ERMI from repeat dust samples, which were collected within three months of the original dust collection. The interclass correlation coefficient between the original and repeat sample was 0.61 indicating moderate-to-high repeatability (Reponen et al., 2012).

ERMI-based analysis can be completed in 24 to 48 h. This is one of the main advantages of this methodology in comparison with the traditional culture analysis that can take days to weeks. Although there is still a limited number of laboratories able to provide ERMI analyses in the world (particularly in Europe), it is expected that in the next years this standardized method will be more accessible and affordable. The ERMI metric may be useful for describing fungal contamination in many situations. For example, it represents a potentially powerful tool when a moisture/mold problem cannot be identified in an inspection, but the health complaints of occupants are persistent. Besides, this understandable exposure scale may be helpful to certain families.

Families with a history of asthma might be interested in fungal contamination. Also, families with an immuno-compromised member, who are prone to fungal infections, may find this analysis useful. For example, infectious fungi such as *Aspergillus fumigatus* were common in both dust and air samples. Another factor to consider in deciding to utilize an ERMI test is the age of the dwelling. In this study, older dwellings had a greater risk of fungal contamination, as evidenced by higher ERMI values. The infrastructure (roofs, pipes, etc) deteriorates over time and a dwelling becomes more difficult to maintain. Newer dwellings in Brittany were less likely to have fungal contamination problems.

The adverse health effects of mold have been shown in many studies that have used qualitative observations for mold assessment, but fewer studies have been able to show this association for quantitatively measured mold (World Health Organization (WHO) Europe, 2009; Mendell et al., 2011). Quantitatively assessed indoor mold exposure has recently been shown to adversely affect respiratory health in European schools (Simoni et al., 2011). In the US, higher

ERMI values in infants' homes were associated with the development of asthma at age seven (Reponen et al., 2011). The environmental dwelling inspection services in Europe might consider providing the most quantitative assessment of fungal contamination possible, so that the efficacy of interventions can be evaluated through a cost-benefit analysis (Charpin et al., 2011). Only when the evaluations are more scientifically rigorous can we expect families or governments to make the changes needed to correct water and fungal contamination problems. In addition to homes, this type of fungal contamination assessment might be important for other indoor environments where children spend time, like day care centers (Roda et al., 2011) or schools.

5. Conclusions

Families need a simple method to evaluate the possibility of fungal contamination in their dwellings. Inspection was successful in this study in finding the fungal contamination but not all inspectors are equally qualified and fungal growth can be hidden in some cases, e.g. inside walls. Almost anyone with an access to a vacuum cleaner can obtain the dust sample for an ERMI analysis. If their dwelling has a high ERMI value, families may choose mold remediation, which includes finding out the reason for water damage, correcting it and removing materials contaminated with fungi.

Acknowledgments

Delphine Méheust's fellowship as well as dwelling visits was funded by the French School of Public Health.

Notice

The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) through its Office of Research and Development, partially funded and collaborated in the research described here. It has been subjected to the Agency's peer review and has been approved as an EPA publication. Mention of trade names or commercial products does not constitute endorsement or recommendation by the EPA for use. Commercial use of the ERMI technology can provide royalties to the EPA.

References

- Bellanger AP, Reboux G, Roussel S, Grenouillet F, Didier-Scherer E, Dalphin JC, et al. Indoor fungal contamination of moisture-damaged and allergic patient housing analysed using real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 2009;49:260–6.
- Bitar D, Van Cauteren D, Lanternier F, Dannaoui E, Che D, Dromer F, et al. Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997–2006. *Emerg Infect Dis* 2009;15:1395–401.

- Charpin D, Baden R, Bex V, Bladt S, Charpin-Kadouch C, Keimeul C, et al. Environmental home inspection services in Western Europe. *Environ Health Prev Med* 2011;16:73–9.
- Delmas MC, Guignon N, Leynaert B, Com-Ruelle L, Annesi-Maesano I, Herbert JB, et al. Prevalence of asthma among children in France. *Arch Pediatr* 2009;16:1261–9.
- Delmas MC, Fuhrman C, pour le groupe épidémiologie et recherche clinique de la SPLF. Asthma in France: a review of descriptive epidemiological data. *Rev Mal Respir* 2010;27:151–9.
- Haugland RA, Brinkman NE, Vesper SJ. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungal cells using real time PCR analysis. *J Microbiol Methods* 2002;50:319–23.
- Haugland RA, Varma M, Wymer LJ, Vesper SJ. Quantitative PCR of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Syst Appl Microbiol* 2004;27:198–210.
- Hollander M, Wolfe DA. Nonparametric statistical methods. New York, NY: John Wiley & Sons; 1973.
- Kaarakainen P, Rintala H, Vepsäläinen A, Hyvärinen A, Nevalainen A, Meklin T. Microbial content of house dust samples determined with qPCR. *Sci Total Environ* 2009;407:4673–80.
- Lignell U, Meklin T, Rintala H, Hyvärinen A, Vepsäläinen A, Pekkanen J, et al. Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomyces in relation to moisture damage of the house. *Lett Appl Microbiol* 2008;47:303–8.
- Méheust D, Le Cann P, Reponen P, Wakefield J, Vesper S, Gangneux JP. Possible application of the Environmental Relative Moldiness Index in France: a pilot study in Brittany 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.06.004>.
- Mendell MJ, Mirer AG, Cheung K, Tong M, Douwes J. Respiratory and allergic health effects of dampness, mold, and dampness-related agents: a review of the epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect* 2011;119:748–56.
- Moularat S, Robine E, Ramalho O, Oturan MA. Detection of fungal development in closed spaces through the determination of specific chemical targets. *Chemosphere* 2008;72:224–32.
- Moularat S, Hulin M, Robine E, Annesi-Maesano I, Caillaud D. Airborne fungal volatile organic compounds in rural and urban dwellings: detection of mould contamination in 94 homes determined by visual inspection and airborne fungal volatile organic compounds method. *Sci Total Environ* 2011;409:2005–9.
- Reboux G, Bellanger AP, Roussel S, Grenouillet F, Millon L. Moulds in dwellings: health risks and involved species. *Rev Mal Respir* 2010;27:169–79.
- Reponen T, Vesper S, Levin L, Johansson E, Burkle J, Ryan P, et al. High Environmental Relative Moldiness Index during infancy as predictor of age seven asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011;107:120–6.
- Reponen T, Lockey J, Bernstein DI, Vesper SJ, Levin L, Khurana Hershey GK, et al. Infant origins of childhood asthma associated with specific molds. *J Allergy Clin Immunol* 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.030>.
- Roda C, Barral S, Ravelomanantsoa H, Dusséaux M, Tribout M, Le Moullec Y, et al. Assessment of indoor environment in Paris child day care centers. *Environ Res* 2011;111:1010–7.
- Simoni M, Cai GH, Norback D, Annesi-Maesano I, Lavaud F, Sigsgaard T, et al. Total viable molds and fungal DNA in classrooms and association with respiratory health and pulmonary function of European schoolchildren. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;8:843–52.
- Van Dyke MV, Martyny JW, Marola J, Ramamoorthy P, Ridder A, Harbeck RJ, et al. Efficacy of occupant-collected dust samples in the evaluation of residential allergen and fungal levels. *J Occup Environ Hyg* 2012;9:14–24.
- Vesper S. Traditional mould analysis compared to a DNA-based method of mould analysis. *Crit Rev Microbiol* 2011;37:15–24.
- Vesper SJ, McKinstry C, Haugland RA, Wymer L, Ashley P, Cox D, et al. Development of an Environmental Relative Moldiness Index for homes in the U.S. *J Occup Environ Med* 2007;49:829–33.
- World Health Organization (WHO) Europe. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. Copenhagen, Denmark: WHO; 2009.

Discussion générale et Perspectives

Chaque jour nous sommes exposés à un mélange complexe de micro-organismes et de composés microbiens dans les environnements intérieurs. Les connaissances restent cependant limitées en ce qui concerne les effets des agents fongiques sur la santé humaine. Le manque de méthode valide et standardisée pour évaluer l'exposition fongique freine les avancées dans ce domaine.

Lors de ces travaux de recherche, différentes approches ont été étudiées afin de mesurer l'exposition aux moisissures dans des environnements intérieurs, tels que les hôpitaux et les logements. Dans cette partie, nous discuterons de manière transversale des méthodes de prélèvements et d'analyses testées. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la stratégie à mettre en œuvre pour détecter une contamination fongique dans les habitats. Diverses perspectives seront abordées afin d'étudier l'impact des moisissures en environnement intérieur sur la santé humaine.



Quel type de prélèvement en environnement intérieur ?

Le choix d'une technique de prélèvement pour mesurer l'exposition fongique dépend du contexte environnemental et repose sur plusieurs critères, tels que la représentativité de l'échantillon et la praticité de la technique. Lors de notre travail bibliographique (Article 1), nous avons observé que les prélèvements d'air, de surface et de poussières sont les principaux échantillons environnementaux étudiés, que ce soit à l'hôpital, dans les logements ou sur les lieux de travail. Nous nous sommes donc intéressés à ces trois types de prélèvement au cours de nos travaux.

Les prélèvements d'air sont fréquemment utilisés pour étudier les effets des moisissures sur la santé respiratoire. Bien que les mesures individuelles représentent mieux le risque lié à l'exposition par inhalation que les mesures environnementales fixes, il n'est pas toujours possible de les utiliser pour des raisons pratiques : on peut citer par exemple que les équipements sont souvent trop encombrants pour les participants des études (OMS 2009). Nous nous sommes donc intéressés à différents biocollecteurs disponibles sur le marché. Nous avons notamment étudié les performances de plusieurs appareils à impaction, dont les caractéristiques physiques permettent une utilisation aisée dans les hôpitaux ou les logements (Chapitre 2). Contrairement à des travaux précédents sur des anciennes versions de biocollecteurs (Nesa et al. 2001), nous n'avons pas observé de différences importantes entre les efficacités de collecte des bactéries et des moisissures avec les dispositifs récemment mis sur le marché. Le système à impaction est utile pour les mesures de surveillance environnementale dans divers services hospitaliers : récemment il a été montré qu'une concentration supérieure à 17 spores d'*Aspergillus fumigatus* par m³ d'air augmentait le risque d'aspergillose invasive chez des patients non immunodéprimés après opérations chirurgicales (Peláez et al. 2012). Ces prélèvements d'air de courte durée sont aussi utilisés pour le diagnostic rapide dans un bâtiment. Cependant les variations spatio-temporelles peuvent parfois rendre difficile l'interprétation des résultats (Hyvärinen et al. 2001). La multiplication des prélèvements est donc généralement requise pour évaluer les concentrations fongiques dans l'air. Puisque la méthode par impaction sur gélose ne permet de dénombrer que la flore cultivable, nous avons également testé un autre type de système qui permet de diversifier les méthodes d'analyses. L'appareil Coriolis (Bertin Technologies) a récemment été proposé comme alternative pour les prélèvements d'air en routine dans le domaine hospitalier, car il permet de prélever de grands volumes d'air sur de courtes durées et est adapté aux analyses par PCR quantitative (Bellanger et al. 2012). Grâce à cet appareil cyclonique portable et autonome, des prélèvements dans un milieu liquide peuvent être effectués dans des environnements faiblement à très contaminés (Chapitres 3 et 4). Nous avons comparé ce système de collection à l'impacteur Sampl'air (AES Chemunex) en suivant la norme ISO Air Intérieur (ISO 16000-18 2011), et nous avons observé une bonne corrélation entre les résultats par culture obtenus dans les logements (données non présentées). Cependant les milieux gélosés impactés dans les environnements très contaminés étaient souvent saturés, alors qu'il était possible d'effectuer des dilutions à partir des échantillons liquides collectés avec le Coriolis.

Des prélèvements de surface sont fréquemment effectués à l'hôpital, particulièrement dans les zones où l'air est traité (Gangneux et al. 2006). Couplés aux prélèvements d'air, ils permettent d'avoir une représentation de la contamination des jours précédents et de vérifier

l'efficacité des procédés de nettoyage-désinfection. Nos travaux ont suggéré que le type d'écouvillon utilisé (écouvillon classique en coton vs. écouvillon en fibres de nylon) aurait une influence sur l'efficacité de collecte et de libération des champignons (Chapitre 3). De plus, les caractéristiques physiques des surfaces prélevées, telles que la rugosité, influenceraient l'efficacité de collecte des micro-organismes. Des prélèvements de surface sont aussi utiles pour mettre en évidence et/ou identifier les moisissures dans les logements (Santucci et al. 2007). Nous avons donc également effectué des prélèvements par écouvillonnage sur les murs des pièces principales dans les 40 habitats visités (données non présentées). Les résultats obtenus après analyse par culture sont cependant difficiles d'interprétation : les données obtenues sont en effet semi-quantitatives, car seuls les groupes fongiques prédominants se développent sur les milieux de culture et ont tendance à inhiber la croissance des autres moisissures moins fréquentes sur les surfaces. Nous considérons néanmoins que cette technique est particulièrement intéressante pour vérifier s'il y a présence d'un développement fongique sur une tache suspecte ou pour valider l'efficacité des mesures correctives mises en place.

Les échantillons de poussières prélevés sur le sol permettent de détecter les micro-organismes qui se sont accumulés au cours du temps (Chao et al. 2002). Ils représentent ainsi une partie de la flore fongique présente auparavant dans l'air. Des corrélations ont d'ailleurs été constatées pour certaines espèces quantifiées à la fois dans les prélèvements d'air et de poussières (Chapitre 4). N'étant pas sujette aux variations temporelles comme les prélèvements d'air, cette approche permet une évaluation de l'exposition sur une longue période. Cependant l'interprétation des résultats doit prendre en compte un certain nombre de facteurs limitants (Verhoeff et al. 1994; Macher 2001). Par exemple, les activités des occupants et des animaux domestiques peuvent modifier la composition de la flore fongique présente dans les bâtiments, en apportant notamment des moisissures de l'extérieur. De plus les habitudes ménagères et d'aération influencent la diversité fongique présente dans les poussières. Le calcul de l'indice ERMI prend en compte ces limites en soustrayant les concentrations de moisissures caractéristiques de l'extérieur aux concentrations des moisissures fréquentes dans les habitats moisiss (Vesper 2011). Le protocole de prélèvement des poussières est relativement simple et peut-être effectué par les occupants. De plus, nous avons montré que les valeurs ERMI déterminées à partir des échantillons de poussières corrélaient significativement avec d'autres mesures de contamination dans l'air (Chapitre 5). Les prélèvements d'air nécessitent cependant l'utilisation d'un biocollecteur sur le terrain, et peuvent gêner les occupants s'ils sont effectués sur une longue période. Les poussières sont ainsi fréquemment prélevées dans les logements et sur les lieux de travail.

Bien que rarement effectué dans les hôpitaux, ce type de prélèvement pourrait être utile dans des gaines de ventilation.

Ces dernières années, des collecteurs électrostatiques de poussières ont été proposés afin de combiner certains avantages des prélèvements d'air et de poussières (Noss et al. 2008; Normand et al. 2009; Frankel et al. 2012; Roussel et al. 2012). Alors que les poussières prélevées au sol contiennent généralement de lourdes particules qui ne peuvent être aérolisées, ce dispositif passif simple permet de collecter les poussières aériennes sur une longue période (jusqu'à plusieurs mois). Il est généralement placé sur une étagère à 1,5 m du sol et récupère les poussières par sédimentation. Cette méthode n'est donc pas affectée par les variations temporelles des concentrations dans l'air, et elle permet de standardiser la surface de collecte et la durée d'accumulation des poussières. Contrairement aux prélèvements effectués au sol, la quantité de poussière recueillie risque cependant de ne pas être suffisante pour effectuer plusieurs analyses avec un même échantillon. Néanmoins ce système de prélèvement bon marché et facile d'utilisation requiert encore des étapes de validation pour évaluer son efficacité comme outil standardisé de mesure en environnement intérieur (Tischer & Heinrich 2012).

Afin d'évaluer l'exposition environnementale des occupants, la stratégie de prélèvements doit prendre en compte de nombreux facteurs (OMS 2009): le mode d'exposition des occupants, la maladie ou les symptômes d'intérêt (si les effets sur la santé sont aigus ou chroniques), les variations supposées de l'exposition suivant le temps et l'espace... Au final, différentes techniques de prélèvements sont généralement requises (Niemeier et al. 2006), car les divers types de prélèvements apportent des informations complémentaires sur la contamination fongique des environnements intérieurs.

Quel niveau d'information sur la flore fongique ?

Plusieurs méthodes d'analyse de la flore fongique ont été utilisées lors de ces travaux de recherche : la méthode culturale, la cytométrie en phase solide, la PCR quantitative. Chacune apporte une information différente pour caractériser la contamination fongique.

La méthode culturale est l'approche de référence pour la surveillance mycologique de l'environnement hospitalier en France (Gangneux et al. 2002). Nous avons étudié différents systèmes de prélèvement d'air par impaction sur gélose qui sont utilisés en routine dans les établissements de santé (Chapitre 2). Ce système de collecte actif peut stresser certains micro-organismes, qui ensuite se développeront difficilement sur le milieu de culture (Stewart et al. 1995). Les travaux effectués avec le cytomètre en phase solide ont mis en évidence la nuance entre la viabilité et la cultivabilité des champignons (Chapitre 3). En effet, environ un tiers des champignons viables détectés par cytométrie n'a pas été quantifié sur des géloses

à l'extrait de malt. Différents facteurs sont connus pour influencer les résultats obtenus par la méthode culturale, notamment le milieu de culture, la température d'incubation et la compétition entre les micro-organismes (Nieguitsila et al. 2011; Wu et al. 2000). Bien que tous les champignons viables de l'environnement ne soient pas pathogènes, nous pouvons nous interroger sur le risque infectieux lié aux champignons non détectés par la méthode culturale.

Certains équipes américaines ont remarqué que la surveillance environnementale par prélèvements d'air par impaction effectués en routine ne leur permettaient pas de prédire les risques d'infections invasives chez les patients immunodéprimés (Falvey & Streifel 2007; Rupp et al. 2008). L'évaluation du risque infectieux serait, selon eux, fortement limitée par les délais nécessaires pour obtenir les résultats par culture. Des méthodes plus rapides seraient donc utiles pour mettre en place des actions correctives et pour vérifier l'efficacité des mesures visant à protéger les zones à risque dans les hôpitaux. La technique de cytométrie en phase solide que nous avons testée permet de quantifier la flore fongique viable en seulement quelques heures, comparativement à plusieurs jours en technique culturale. Cependant il est difficile d'évaluer le risque infectieux lié aux micro-organismes détectés car tous les champignons ne peuvent être identifiés précisément par observation microscopique. D'autres méthodes complémentaires, telles que de l'immuno-marquage, sont donc nécessaires pour évaluer qualitativement la flore fongique détectée. Une autre alternative pour quantifier spécifiquement des champignons pathogènes viables serait l'utilisation d'outils qPCR couplée à un prétraitement des échantillons avec du propidium monoazide : cet agent intercalant pénètre sélectivement dans les cellules qui présentent des dommages membranaires, empêchant ainsi l'amplification (Vesper et al. 2008).

Les outils qPCR permettent en effet d'obtenir en une ou deux journées des informations quantitatives et qualitatives sur la flore microbienne. La méthode classiquement utilisée (sans prétraitement au propidium monoazide) ne permet pas de distinguer les cellules viables des cellules non viables. Néanmoins, les cellules fongiques mortes peuvent potentiellement représenter un risque pour la santé car elles sont aussi sources de molécules irritantes, d'allergènes et/ou de mycotoxines. Grâce à sa large gamme de quantification (généralement de l'ordre de 1 à 10^{10} spores), la technique qPCR est utilisée pour analyser différents types d'échantillons environnementaux (Stetzenbach et al. 2004). De nombreux outils ont été créés afin de quantifier spécifiquement des groupes fongiques connus pour leur potentiel infectieux, allergisant ou toxique. Dans nos travaux sur les logements (Chapitre 4 et 5), nous avons utilisé un panel de 36 cibles permettant de déterminer l'indice ERMI (Vesper, McKinstry, Haugland, Wymer, et al. 2007). Plusieurs groupes fongiques avaient en effet été retenus après des recherches bibliographiques : on y

retrouve notamment des espèces allergisantes et des moisissures connues pour leur capacité à produire des mycotoxines, comme en témoigne le Tableau 3. De nombreuses équipes insistent sur l'importance de caractériser la flore fongique des environnements intérieurs au niveau de l'espèce, car tous les champignons n'ont pas le même potentiel pour induire des effets sur la santé (Boutin-Forzano et al. 2006; Eduard 2009; Tischer & Heinrich 2012). Nous avons remarqué que les groupes fongiques cibles quantifiés dans l'indice ERMI correspondent aux principales moisissures préalablement identifiées dans des logements français (Boutin-Forzano et al. 2004; CSHPF 2006; Dassonville et al. 2008; Reboux et al. 2009). Ainsi, malgré les limites de cette étude pilote, nous considérons que l'indice ERMI est un outil prometteur pour mesurer la contamination fongique des logements en France.

Toutes les approches développées ont leurs propres limites et ne permettent de caractériser que de manière partielle la flore fongique (flore cultivable, flore viable, micro-organismes spécifiquement sélectionnés). Il a par exemple été constaté une différence de 10^2 à 10^3 entre les concentrations d'espèces fongiques estimées par culture et par qPCR (Meklin et al. 2004). Le choix de la technique utilisée dépend généralement du niveau d'information requis pour l'étude, mais aussi des contraintes pratiques et économiques. Enfin, une information détaillée sur les procédures d'analyses est nécessaire pour bien interpréter les mesures environnementales et pour comparer des études, car de nombreux facteurs peuvent influencer les résultats obtenus (OMS 2009).

Perspectives pour évaluer l'exposition fongique dans les logements

Dans nos travaux de recherche, nous nous sommes essentiellement intéressés à la problématique des logements humides et/ou moisissus (Chapitres 4 et 5). Cette problématique représente un enjeu de santé publique, particulièrement dans les pays développés où la prévalence des maladies respiratoires chroniques ne cesse d'augmenter. A de multiples reprises, l'exposition aux moisissures a été associée à l'exacerbation de l'asthme ; et quelques études ont montré que les moisissures seraient impliquées dans le développement de l'asthme (OMS 2009). Les effets sur la santé associés aux logements humides et/ou moisissus se traduisent par des conséquences économiques importantes. Par exemple, il a été estimé que les coûts liés à l'asthme attribuables à ces logements s'élevaient à 3,5 milliards de dollars chaque année aux États-Unis (Mudarri & Fisk 2007).

Cependant, de nombreuses incertitudes demeurent pour décrire la relation entre l'exposition aux moisissures et les effets sur la santé. L'interprétation des résultats observés dans les études épidémiologiques est souvent limitée par les difficultés de mesure objective des niveaux d'exposition, ainsi que par les difficultés de diagnostic des pathologies (InVS 2005). De plus, les mécanismes d'action des moisissures sont complexes puisque, comme illustré

dans la Figure 4, différents composés fongiques sont susceptibles d'entraîner des effets sur la santé. D'autre part, les conditions d'humidité sont favorables à la prolifération d'une multitude d'agents biologiques et peuvent entraîner une augmentation des niveaux d'agents chimiques irritants ou sensibilisants dans l'air intérieur. Ces agents biologiques et chimiques constituent donc des facteurs confondants dans les études épidémiologiques (INSPQ 2002b). Enfin, les individus sont exposés de façon simultanée à différentes moisissures dont les potentiels allergisants et toxiques varient d'une espèce à l'autre (Eduard et al. 2012).

Récemment, il a été montré dans une cohorte américaine que l'exposition précoce à trois espèces fongiques était associée à l'asthme chez des enfants âgés de 7 ans (Reponen et al. 2012). Ces espèces fréquemment retrouvées dans les logements humides étaient *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus unguis*, et *Penicillium variable*. Cette étude prospective menée à Cincinnati s'avère unique car, pour la première fois, des moisissures spécifiques ont été associées au développement de l'asthme. Auparavant, seuls certains genres fongiques contenant des centaines d'espèces, tels qu'*Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium*, avaient été associés à l'asthme (Salo et al. 2006; Agarwal & Gupta 2011; Bundy et al. 2009). Plusieurs chercheurs estiment que les méthodes utilisées en mycologie depuis des décennies, telles que la microscopie et l'analyse culturale, ont freiné les avancées dans ce domaine (Peccia & Hernandez 2006; Vesper 2011). Ces dernières années, l'indice ERMI basé sur des analyses qPCR s'est avéré un outil déterminant afin de prédire le développement de l'asthme chez les enfants (Reponen et al. 2011). Notre étude menée dans des logements bretons a montré que cet indice développé aux États-Unis pouvait aussi être utilisé en France (Chapitre 4) : en effet les 36 groupes fongiques ont été retrouvés dans les échantillons environnementaux et l'ERMI a permis de discriminer les logements moisissés des logements non contaminés. Ces travaux pourraient cependant être déployés dans une campagne nationale afin de tester l'indice et d'élaborer une échelle de contamination fongique la plus représentative possible des logements français.

Ces outils moléculaires pourraient toutefois être améliorés et adaptés afin de les utiliser en France. Notre étude a notamment montré des différences de concentrations pour certaines espèces entre les États-Unis et la France (Chapitre 4). Par exemple, nous avons remarqué que certaines espèces xérophiles telles que *Aspergillus restrictus* étaient significativement plus fréquentes dans les échantillons bretons que dans les échantillons américains. Le même constat avait été fait lors d'une comparaison entre les États-Unis et l'Angleterre (Vesper et al. 2005). Ces différences géographiques pourraient s'expliquer par l'influence des climats sur la diversité des moisissures dans les environnements intérieurs (Amend et al. 2010). Avant la création de l'indice ERMI, un panel de 82 outils qPCR avait été testé aux États-Unis afin d'identifier les groupes fongiques pertinents pour l'indice (Meklin et al. 2004).

Dans un premier temps, ce large panel pourrait être utilisé en France afin de sélectionner les outils les plus adaptés. Il est probable que la place de certaines espèces dans le groupe 1 de l'indice ERMI ne soit pas appropriée pour créer un indice en Europe, comme en témoigne une étude finlandaise où *Aureobasidium pullulans* et *Eurotium* spp. étaient à la fois fréquents dans des bâtiments moisissés et non moisissés (Pitkäranta et al. 2011). De plus, afin d'identifier de nouveaux groupes fongiques indicateurs des logements humides, il serait intéressant d'utiliser une approche globale pour étudier la diversité de la flore fongique. Une analyse dite de « métagénomique » a par exemple été effectuée afin de caractériser les communautés fongiques présentes dans des poussières (Pitkäranta et al. 2008). De nombreuses espèces de Basidiomycètes et d'Ascomycètes ont ainsi été révélées. Dans une étude plus récente de métagénomique, le Basidiomycète *Serpula lacrymans* a été mis en évidence dans des bâtiments humides (Pitkäranta et al. 2011). Ce champignon lignivore, communément appelée la mûre, est responsable de la pourriture du bois d'œuvre qui est source de nombreux dégâts dans l'Ouest de la France (Maurice et al. 2011). La quantification de quelques champignons dévastateurs dans l'indice moléculaire pourrait éventuellement améliorer la détection des logements contaminés (Horisawa et al. 2009).

Les outils qPCR pourront aussi être améliorés au cours des prochaines années, en intégrant les informations obtenues par les nouvelles techniques moléculaires. La dernière génération de séquenceurs promet en effet de réelles avancées dans le domaine de la santé environnementale (Peccia et al. 2011; Eduard et al. 2012). Récemment, une étude portant sur la contamination des logements a utilisé en parallèle l'indice ERMI et une technique de pyroséquençage (Nonnenmann et al. 2012). Cette méthode, encore onéreuse actuellement, a permis de caractériser la flore fongique de poussières domestiques, en identifiant souvent les champignons jusqu'au niveau de l'espèce. Cependant, elle ne permet pas une quantification absolue, d'où l'intérêt de l'approche combinée avec les outils qPCR. Le séquençage à haut débit permettra certainement d'identifier de nouveaux groupes fongiques fréquents dans les logements humides et qui peuvent avoir un effet sur la santé des occupants. L'enjeu futur sera donc d'adapter l'indice moléculaire tel que l'ERMI pour améliorer l'évaluation de l'exposition fongique dans les études épidémiologiques. Bien que le coût analytique de la PCR quantitative diminuera probablement dans les prochaines années, le nombre d'outils qPCR ne devra pas augmenter fortement pour calculer l'indice. Un des objectifs finaux serait d'identifier les espèces fongiques impliquées dans les maladies respiratoires afin de développer des stratégies de prévention, voire thérapeutiques. Outre ces travaux qui nécessitent encore de nombreuses années de recherche, il paraît important d'adapter l'indice moléculaire et de le rendre accessible pour le diagnostic de la contamination fongique des logements à une échelle individuelle. Un indice réduit à

seulement 13 groupes fongiques, appelé ARMI (American Relative Moldiness Index), a notamment été développé aux États-Unis et est proposé comme outil de diagnostic par certains laboratoires d'analyses environnementales (Vesper, McKinstry, Bradham, et al. 2009). Ce type d'indice réduit serait de fait moins coûteux que l'analyse ERMI classique, et il pourrait être utile pour des familles de patients asthmatiques afin qu'elles mettent en place des actions si leur logement est contaminé par les moisissures.

Vers une démarche globale de santé publique

Ne disposant pas encore de valeurs guides d'exposition aux moisissures, l'Organisation Mondiale de la Santé recommande de prévenir les problèmes d'humidité et de moisissures dans les environnements intérieurs (OMS 2009). Des campagnes permanentes de sensibilisation et de prévention sont ainsi fortement conseillées pour informer les populations. En France, il y a eu ces dernières années une prise de conscience des pouvoirs publics qui placent désormais la qualité de l'air intérieur au cœur de leur politique tel que l'illustre le deuxième Plan national santé environnement. Un site internet a récemment été créé par l'Institut National de Promotion et d'Éducation pour la Santé (INPES) afin d'informer le grand public sur la problématique de la pollution de l'air intérieur (www.prevention-maison.fr). D'après l'enquête nationale Baromètre santé environnement 2007 de l'INPES, 85% des personnes interrogées pensent que les moisissures contribuent à la pollution de l'air dans un logement (Ménard et al. 2008). Ces polluants d'origine biologique sont donc relativement bien connus comparés à d'autres polluants chimiques des environnements intérieurs. De plus en plus sensibilisés à la pollution de l'air intérieur, les Français ont pour principal geste préventif d'aérer les habitats : en effet, 84 % des enquêtés déclarent aérer leur logement en ouvrant les fenêtres au moins une fois par jour en hiver (Ménard et al. 2008). Cependant des comportements à risque restent fréquents, comme par exemple le fait de boucher les orifices d'aération dans les pièces (ce qui est effectué par environ 5 % de la population).

Un récent rapport de l'OMS rappelle l'importance d'informer les occupants de la manière dont l'humidité est générée, et de leur apprendre comment l'utilisation de la ventilation permet d'éviter l'accumulation d'humidité (OMS 2011). En effet, les principales sources de vapeur d'eau à l'intérieur du logement sont les occupants (30 à 40 litres/semaine pour une famille de quatre personnes), les activités domestiques (douches, cuisson, lessive – 15 à 20 litres/semaine), et le séchage de la lessive à l'intérieur (10 à 15 litres/semaine) (INSPQ 2002b). Les occupants sont responsables de l'entretien des locaux, ainsi que de la gestion de l'eau, de la température, et de la ventilation afin d'éviter l'humidité et la croissance des moisissures (OMS 2009). La détérioration de matériaux imperméabilisants, tels que les joints, peut être à l'origine de problèmes d'infiltration chronique dans les bâtiments. Lors d'un

dégât des eaux ou d'une inondation, il est nécessaire d'évacuer l'eau accumulée et d'assécher rapidement tous les matériaux détrempés. Des problèmes de condensation chronique peuvent aussi survenir lors d'une insuffisance d'isolation thermique au niveau des murs ou du plafond.

Des bâtiments bien conçus et bien construits sont ainsi essentiels pour prévenir et contrôler les excès d'humidité et la croissance microbienne, comme en témoignent les différentes recommandations de l'OMS (Figure 10). Les propriétaires doivent donc veiller à la bonne construction et à la maintenance des bâtiments, en s'appuyant sur des conseils techniques des professionnels. Lors de nos visites dans les logements, nous avons constaté à plusieurs reprises des développements de moisissures provoqués par des travaux de rénovation mal réalisés (problèmes de ponts thermiques, manque de ventilation suite au changement de fenêtres...). Le Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement a récemment édité un guide à destination des maîtres d'ouvrage et des maîtres d'œuvre, concernant la construction de bâtiments neufs ainsi que les rénovations (MEDDTL 2011). Ce guide recommande notamment une humidité relative de l'air inférieure à 60 % dans les bâtiments pour d'éviter le développement des acariens et des moisissures. Cependant, il semble important de proposer des formations spécifiques à la problématique des moisissures et de l'humidité, afin de veiller à la bonne réalisation des travaux de rénovation et à la protection des personnes lors des actions de décontamination des moisissures.

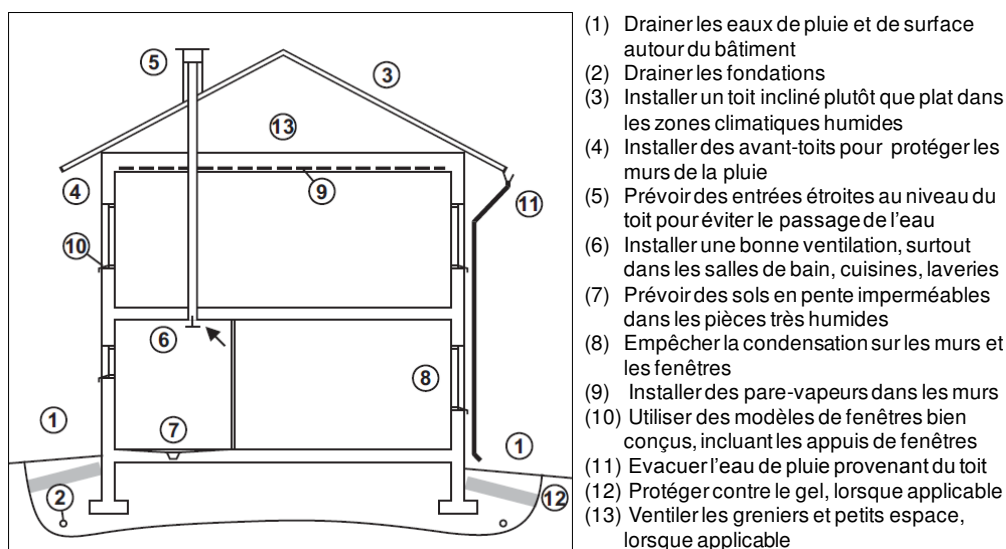


Figure 10. Principales recommandations pour la conception et la construction de bâtiments afin de prévenir les problèmes d'humidité (D'après OMS 2009)

Certaines populations sont particulièrement vulnérables à l'exposition aux moisissures, telles que les personnes souffrant de maladies respiratoires chroniques. Des tests cutanés sont fréquemment réalisés chez les patients afin de détecter des allergies à certaines moisissures telles qu'*Alternaria* (Randriamanantany et al. 2010). Cependant, des résultats négatifs n'assurent pas que les patients ne soient pas allergiques à d'autres moisissures. Par exemple, il n'existe à l'heure actuelle pas de tests spécifiques aux espèces fongiques récemment associées à l'asthme (Reponen et al. 2012). Il s'avère ainsi important de rechercher les moisissures visibles ou cachées dans les environnements fréquentés par les patients et de mettre en place les actions nécessaires pour contrôler les risques pour la santé (Rabinovitch 2012). Bien que le personnel médical interroge les patients asthmatiques ou allergiques sur les sources potentielles d'exposition, il est généralement difficile d'avoir une représentation fidèle de leur environnement domestique (Charpin-Kadouch et al. 2008). Depuis les années 2000, la profession de Conseiller Médical en Environnement Intérieur se développe en France afin de détecter dans les logements des patients les facteurs déclenchant et aggravant des maladies respiratoires. Les moisissures font partie des divers polluants recherchés par ces professionnels qui interviennent sur prescription médicale et qui apportent des conseils pour réduire l'exposition des patients. Des études sont néanmoins encore nécessaires pour évaluer l'efficacité de ces visites sur la santé des patients (Charpin et al. 2010).

L'impact des mesures visant à résoudre les problèmes d'humidité et de moisissures sur la santé des occupants reste encore peu étudié (Tischer & Heinrich 2012). Deux études ont montré des effets bénéfiques chez des patients asthmatiques après avoir éliminé les

moisissures visibles ou effectué des travaux dans leurs logements (Burr et al. 2007; Kercksmar et al. 2006). Puisque la prévalence de l'humidité et des moisissures est particulièrement importante dans les logements mal entretenus et habités par des populations à faible revenu, des actions prioritaires devraient être mises en place pour prévenir ces expositions environnementales néfastes chez ces populations vulnérables (OMS 2009). Des études participatives seraient appropriées pour évaluer l'efficacité des interventions. Ce type d'étude a notamment été mis en place dans des quartiers défavorisés américains, afin de tester l'efficacité d'une stratégie de contrôle de divers polluants sur la morbidité de l'asthme chez les enfants (Swartz et al. 2004). La mobilisation de différents acteurs (tels que des professionnels de la santé, des travailleurs sociaux, des collectivités, des associations, des professionnels du bâtiment, et des chercheurs) permettrait d'agir auprès des populations défavorisées et des patients à risque. Les études sur la problématique de l'humidité et des moisissures requièrent en effet des équipes multidisciplinaires (InVS 2005). Une équipe en Nouvelle Zélande a par exemple montré que l'amélioration de l'isolation des logements diminuait l'exposition aux moisissures et améliorait la santé respiratoire des habitants (Howden-Chapman et al. 2007). Plusieurs chercheurs indiquent que ces résultats sont prometteurs et que ce type d'étude interventionnelle devrait être mise en place dans d'autres zones climatiques (Krieger et al. 2010). Outre les impacts sur la santé et la qualité de vie des participants, cette approche participative permettrait de mieux comprendre les facteurs qui influencent le développement des moisissures en environnement intérieur, ainsi que de mieux appréhender le rôle de l'exposition fongique dans la santé respiratoire.

Bibliographie

- ACGIH, 1999. *Bioaerosols : assessment and control*, Janet Macher Editor.
- Afrite, A., Allonier, C., Com-Ruelle, L. & Le Guen, N., 2011. *L'asthme en France en 2006 : prévalence, contrôle et déterminants*, Institut de recherche et documentation en économie de la santé. Available at: <http://www.irdes.fr/Publications/Rapports2011/rap1820.pdf>.
- Agarwal, R. & Gupta, D., 2011. Severe asthma and fungi: current evidence. *Medical mycology*, 49(S1), p.S150-157.
- Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S., Knemeyer, O., Perruccio, K., Elluru, S.R., Clavaud, C., Paris, S., et al., 2009. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, 460(7259), p.1117-1121.
- Amend, A.S., Seifert, K.A., Samson, R. & Bruns, T.D., 2010. Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones than in the tropics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), p.13748-13753.
- Andersen, A.A., 1958. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *Journal of Bacteriology*, 76(5), p.471-484.
- Annesi-Maesano, I., 1998. Épidémiologie de la rhinite. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 38(7), p.591-600.
- Bailey, K.L., Meza, J.L., Smith, L.M., Von Essen, S.G. & Romberger, D.J., 2008. Agricultural exposures in patients with COPD in health systems serving rural areas. *Journal of Agromedicine*, 12(3), p.71-76.
- Bauchau, V. & Durham, S.R., 2004. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *European Respiratory Journal*, 24(5), p.758-764.
- Bayry, J., Aimanianda, V., Guijarro, J.I., Sunde, M. & Latgé, J.-P., 2012. Hydrophobins - Unique fungal proteins. *PLoS Pathog*, 8(5), p.e1002700.
- Beasley, R., 1998. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *The Lancet*, 351(9111), p.1225-1232.
- Bellanger, A.-P., Reboux, G., Scherer, E., Vacheyrou, M. & Millon, L., 2012. Contribution of a cyclonic-based liquid air collector for detecting *Aspergillus fumigatus* by QPCR in air samples. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 9(1), p.D7-D11.
- Bessot, J.C., Stenger, R. & Pauli, G., 1997. Allergies respiratoires chez les vignerons. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 37(6), p.732-740.
- Bex, V. & Squinazi, F., 2006. Mise en évidence de moisissures des ambiances intérieures par la mesure des (1→3)-[beta]-D-glucanes. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 46(3), p.184-187.
- Bloom, E., Nyman, E., Must, A., Pehrson, C. & Larsson, L., 2009. Molds and mycotoxins in indoor environments - A survey in water-damaged buildings. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 6(11), p.671-678.

- Boulet, L.-P., Turcotte, H., Laprise, C., Lavertu, C., Bedard, P.-M., Lavoie, A. & Hébert, J., 1997. Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 27(1), p.52–59.
- Bourke, S.J., Dalphin, J.C., Boyd, G., McSharry, C., Baldwin, C.I. & Calvert, J.E., 2001. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. *Eur Respir J*, 18(S32), p.81S-92.
- Boutin-Forzano, S., Charpin-Kadouch, C., Chabbi, S., Bennedjai, N., Dumon, H. & Charpin, D., 2004. Wall relative humidity: a simple and reliable index for predicting *Stachybotrys chartarum* infestation in dwellings. *Indoor Air*, 14(3), p.196-199.
- Boutin-Forzano, S., Charpin-Kadouch, C., Gouitaa, M., Dumon, H. & Charpin, D., 2006. Audit environnemental des logements : intérêt d'identifier la ou les moisissure(s) en cause. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 46(3), p.197-203.
- Braubach, M., Jacobs, D. E. & Ormandy, D., 2011. *Environmental burden of disease associated with inadequate housing: a method guide to the quantification of health effects of selected housing risks in the WHO European region.*, OMS. Available at: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/142077/e95004.pdf.
- Bundy, K.W., Gent, J.F., Beckett, W., Bracken, M.B., Belanger, K., Triche, E. & Leaderer, B.P., 2009. Household airborne *Penicillium* associated with peak expiratory flow variability in asthmatic children. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 103(1), p.26-30.
- Bünger, J., Schappler-Scheele, B., Hilgers, R. & Hallier, E., 2007. A 5-year follow-up study on respiratory disorders and lung function in workers exposed to organic dust from composting plants. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 80(4), p.306-312.
- Burr, M.L., Matthews, I.P., Arthur, R.A., Watson, H.L., Gregory, C.J., Dunstan, F.D.J. & Palmer, S.R., 2007. Effects on patients with asthma of eradicating visible indoor mould: a randomised controlled trial. *Thorax*, 62(9), p.767 -772.
- Butler, S., Williams, M., Tukuitonga, C. & Paterson, J., 2003. Problems with damp and cold housing among Pacific families in New Zealand. *The New Zealand medical journal*, 116(1177), p.U494.
- Chao, H., Milton, D., Schwartz, J. & Burge, H.A., 2002. Dustborne fungi in large office buildings. *Mycopathologia*, 154(2), p.93-106.
- Charpin, D., Baden, R., Bex, V., Bladt, S., Charpin-Kadouch, C., Keimeul, C., Mata, P., Blay, Frédéric, et al., 2010. Environmental home inspection services in Western Europe. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 16(2), p.73-79.
- Charpin-Kadouch, C., Mouche, J.-M., Quéralt, J., Ercoli, J., Hugues, B., Garon, M., Dumon, H. & Charpin, D., 2008. Le Conseil Habitat-Santé dans la prise en charge des maladies allergiques respiratoires. *Revue des Maladies Respiratoires*, 25(7), p.821-827.
- Clarke, J.A., Johnstone, C.M., Kelly, N.J., McLean, R.C., anderson, J.A., Rowan, N.J. & Smith, J.E., 1999. A technique for the prediction of the conditions leading to mould growth in buildings. *Building and Environment*, 34(4), p.515-521.

- Cramer, R., Zeller, S., Glaser, A.G., Vilhelmsson, M. & Rhyner, C., 2009. Cross-reactivity among fungal allergens: a clinically relevant phenomenon? *Mycoses*, 52(2), p.99–106.
- Crawford, C., Reponen, T., Lee, T., Iossifova, Y., Levin, L., Adhikari, A. & Grinshpun, S.A., 2009. Temporal and spatial variation of indoor and outdoor airborne fungal spores, pollen, and (1→3)- β -D-glucan. *Aerobiologia*, 25(3), p.147-158.
- CSHPF, 2006. *Contaminations fongiques en milieux intérieurs: Diagnostic, Effets sur la santé respiratoire, Conduite à tenir*, Available at: http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/cshpf/r_mv_0906_contamfongiques.pdf.
- Curtis, L., Lieberman, A., Stark, M., Rea, W. & Vetter, M., 2004. Adverse health effects of indoor molds. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, 14(3), p.261-274.
- Dalphin, J.C., 1996. La bronchite chronique obstructive (BCO) en milieu agricole fourrager. *Revue des maladies respiratoires*, 13(6), p.575-581.
- Dalphin, J.C., Roussel, S., Reboux, G. & Piarroux, R., 2005. Les actualités sur les pneumopathies d'hypersensibilité en milieu rural. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 45(3), p.183-188.
- Dassonville, C., Demattei, C., Detaint, B., Barral, S., Bex-Capelle, V. & Momas, I., 2008. Assessment and predictors determination of indoor airborne fungal concentrations in Paris newborn babies' homes. *Environmental Research*, 108(1), p.80-85.
- Douwes, J., 2005. (1→3)-beta-D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence. *Indoor Air*, 15(3), p.160-169.
- Duquenne, P. & Greff-Mirguet, G., 2005. L'échantillonnage et l'analyse des aérosols microbiens. *Hygiène et sécurité du travail*, 198, p.23-28.
- Van Dyke, M.V., Martyny, J.W., Marola, J., Ramamoorthy, P., Ridder, A., Harbeck, R.J. & Rose, C.S., 2012. Efficacy of occupant-collected dust samples in the evaluation of residential allergen and fungal levels. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 9(1), p.14-24.
- Eduard, W., 2009. Fungal spores: A critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Critical Reviews in Toxicology*, 39(10), p.799-864.
- Eduard, W., Heederik, D., Duchaine, C. & Green, B.J., 2012. Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(2), p.334-339.
- Eduard, W., Pearce, N. & Douwes, J., 2009. Chronic bronchitis, COPD, and lung function in farmers: The role of biological agents. *Chest*, 136(3), p.716-725.
- Falvey, D.G. & Streifel, A.J., 2007. Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. *Journal of Hospital Infection*, 67(1), p.35-41.
- Fischer, G. & Dott, W., 2003. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Archives of Microbiology*, 179(2), p.75-82.

- Fleming, R.V., Walsh, T.J. & Anaissie, E.J., 2002. Emerging and less common fungal pathogens. *Infectious Disease Clinics of North America*, 16(4), p.915-933.
- Frankel, M., Timm, M., Hansen, E.W. & Madsen, A.M., 2012. Comparison of sampling methods for the assessment of indoor microbial exposure. *Indoor Air*, In press.
- Fréalle, E., Lestrez, C., Skierlak, T., Melboucy, D., Guery, B., Durand-Joly, I., Delhaes, L. & Loukili, N., 2011. Fungal aero-decontamination efficacy of mobile air-treatment systems. *Medical Mycology*, p.1-9.
- Fullerenger, S.L., Seguin, D., Warin, S., Bezille, A., Desterque, C., Arné, P., Chermette, R., Bretagne, S., et al., 2006. Evolution of the environmental contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France. *Poultry science*, 85(11), p.1875-1880.
- Gangneux, J.-P., Adjidé, C.-C., Bernard, L., Botterel, F., Carel, A., Castel, O., Derouin, F., Hoarau, G., et al., 2012. Appréciation quantitative du risque fongique en cas de travaux en établissements de santé : propositions d'indicateurs d'impact des mesures de gestion du risque infectieux fongique. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 22(1), p.64-71.
- Gangneux, J.-P., Bousseau, A., Cornillet, A. & Kauffmann-Lacroix, C., 2006. Maîtrise du risque fongique environnemental dans les établissements de santé. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 16(4), p.204-211.
- Gangneux, J.-P., Camus, C. & Philippe, B., 2010. Epidemiology of invasive aspergillosis and risk factors in non neutropaenic patients. *Revue des Maladies Respiratoires*, 27(8), p.e34-e46.
- Gangneux, J.-P., Poirot, J.L., Morin, O., Derouin, F., Bretagne, S., Datry, A., Kauffmann-Lacroix, C., Paugam, A., et al., 2002. Surveillance mycologique de l'environnement pour la prévention de l'aspergillose invasive: Propositions de standardisation des méthodologies et des modalités d'application. *La Presse médicale*, 31(18), p.841-848.
- Garcia-Vidal, C., Upton, A., Kirby, K.A. & Marr, K.A., 2008. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: Biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 47(8), p.1041-1050.
- Górny, R.L., 2004. Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air - a review. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 11(2), p.185-197.
- Gravesen, S., Nielsen, Iversen, R. & Nielsen, K.F., 1999. Microfungal contamination of damp buildings - examples of risk constructions and risk materials. *Environmental Health Perspectives*, 107(S3), p.505-508.
- Green, B.J., Tovey, Euan R, Sercombe, J.K., Blachere, F.M., Beezhold, D.H. & Schmechel, D., 2006. Airborne fungal fragments and allergenicity. *Medical Mycology*, 44(S1), p.S245-S255.
- Green, B.J., Zinovia Mitakakis, T. & Tovey, Euan Roger, 2003. Allergen detection from 11 fungal species before and after germination. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2), p.285-289.

- Guillot, J. & Chermette, R., 2001. Aspergilloses des oiseaux. *La Revue du praticien*, 51(7), p.704-707.
- Haiduven, D., 2009. Nosocomial aspergillosis and building construction. *Medical Mycology*, 47(S1), p.S210-S216.
- Hendry, K.M. & Cole, E.C., 1993. A review of mycotoxins in indoor air. *Journal of toxicology and environmental health*, 38(2), p.183-198.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., et al., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), p.509-547.
- Horisawa, S., Sakuma, Y. & Doi, S., 2009. Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi. *Journal of Wood Science*, 55(2), p.133-138.
- Horré, R., Symoens, F., Delhaes, L. & Bouchara, J.-P., 2010. Fungal respiratory infections in cystic fibrosis: a growing problem. *Medical Mycology*, 48(O1), p.S1-S3.
- Host, S., Grange, D., Sommen, C. & Chatignoux, E., 2011. *Effets sanitaires des moisissures dans l'habitat - L'enquête Esmha, pilote d'une étude épidémiologique en Ile-de-France*, ORS Ile-de-France. Available at: http://www.ors-idf.org/dmdocuments/rapport_ors_esmha_final.pdf.
- Howden-Chapman, P., Matheson, A., Crane, J., Viggers, H., Cunningham, M., Blakely, T., Cunningham, C., Woodward, A., et al., 2007. Effect of insulating existing houses on health inequality: cluster randomised study in the community. *BMJ*, 334(7591), p.460-460.
- Husman, T., 1996. Health effects of indoor-air microorganisms. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 22(1), p.5-13.
- Hyvärinen, A., Meklin, T., Vepsäläinen, A. & Nevalainen, Aino, 2002. Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials - concentrations and diversity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49(1), p.27-37.
- Hyvärinen, A., Vahteristo, M., Meklin, T., Jantunen, M., Nevalainen, A. & Moschandreas, D., 2001. Temporal and spatial variation of fungal concentrations in indoor air. *Aerosol Science and Technology*, 35(2), p.688.
- INRS, 2003. Tableaux des maladies professionnelles. Available at: <http://www.inrs.fr/accueil/produits/bdd/mp.html>.
- INSPQ, 2002a. *Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur: document synthèse* M.-A. d'Halewyn, J.-M. Leclerc, N. King, M. Bélanger, M. Legris, & Y. Frenette, éd., Montréal: Institut national de santé publique du Québec. Available at: http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/127_RisquesMoisissuresMilieuInterieurResume.pdf.
- INSPQ, 2002b. *Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur: rapport scientifique* M.-A. d'Halewyn, J.-M. Leclerc, N. King, M. Bélanger, M. Legris, & Y. Frenette, éd., Montréal: Institut national de santé publique du Québec. Available at: http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/126_RisquesMoisissuresMilieuInterieur.pdf.

- INSPQ, 2008. *Validité de deux instruments de mesure des caractéristiques des habitations liées à la qualité de l'air intérieur*, Montréal: Institut national de santé publique du Québec. Available at: http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/856_Etude_validite_instruments.pdf.
- InVS, 2005. *Moisissures dans l'air intérieur et santé*, Extrapol. Available at: http://www.invs.sante.fr/publications/extrapol/27/extrapol_27.pdf.
- ISO 14698-1, 2003. Cleanrooms and associated controlled environments: biocontamination control. Part 1: General principles and methods. Available at: <http://www.iso.org>.
- ISO 16000-18, 2011. Indoor air. Part 18: Detection and enumeration of moulds – Sampling by impaction. Available at: <http://www.iso.org>.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, Celio, G., Gueidan, C., et al., 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443(7113), p.818-822.
- Janson, C., Anto, J., Burney, P., Chinn, S., Marco, R. de, Heinrich, J., Jarvis, Kuenzli, N., et al., 2001. The European Community Respiratory Health Survey: what are the main results so far? *European Respiratory Journal*, 18(3), p.598-611.
- Jarvis, B.B. & Miller, J.D., 2005. Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 66(4), p.367-372.
- Jouneau, S., Boché, A., Brinchault, G., Fekete, K., Guillot, Bayat, S. & Desrues, B., 2012. On-site screening of farming-induced chronic obstructive pulmonary disease with the use of an electronic mini-spirometer: results of a pilot study in Brittany, France. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 85(6), p.623-630.
- Kauffmann-Lacroix, C., Bousseau, Anne, Dalle, F., Brenier-Pinchart, M.-P., Delhaes, L., Machouart, M., Gari-Toussaint, Martine, Datry, Annick, et al., 2008. Prevention of fungal infections related to the water supply in French hospitals: proposal for standardization of methods. *Presse médicale*, 37(5), p.751-759.
- Kawamura, S., Maesaki, S., Tomono, K., Tashiro, T. & Kohno, S., 2000. Clinical evaluation of 61 patients with pulmonary aspergilloma. *Internal medicine*, 39(3), p.209-212.
- Kendrick, B., 2001. Fungi and the history of mycology. In eLS. John Wiley & Sons, Ltd. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0002320/abstract>.
- Kercsmar, C.M., Dearborn, D.G., Schluchter, M., Xue, L., Kirchner, H.L., Sobolewski, J., Greenberg, S.J., Vesper, S.J., et al., 2006. Reduction in asthma morbidity in children as a result of home remediation aimed at moisture sources. *Environmental Health Perspectives*, 114(10), p.1574-1580.
- Kohlhuber, M., Mielck, A., Weiland, S.K. & Bolte, G., 2006. Social inequality in perceived environmental exposures in relation to housing conditions in Germany. *Environmental Research*, 101(2), p.246-255.
- Korpi, A., Kasanen, J.P., Alarie, Y., Kosma, V.M. & Pasanen, A.-L., 1999. Sensory irritating potency of some microbial volatile organic compounds (MVOCs) and a mixture of five MVOCs. *Archives of environmental health*, 54(5), p.347-352.
- Kreja, L. & Seidel, H.-J., 2002. Evaluation of the genotoxic potential of some microbial volatile organic compounds (MVOC) with the comet assay, the micronucleus assay

- and the HPRT gene mutation assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 513(1–2), p.143-150.
- Krieger, J., Jacobs, David E, Ashley, P.J., Baeder, A., Chew, G.L., Dearborn, D., Hynes, H.P., Miller, J.D., et al., 2010. Housing interventions and control of asthma-related indoor biologic agents: a review of the evidence. *Journal of public health management and practice*, 16(S5), p.S11-20.
- Kurup, V.P., 2003. Fungal allergens. *Current Allergy and Asthma Reports*, 3(5), p.416-423.
- Kurup, V.P., Shen, H.-D. & Vijay, H., 2002. Immunobiology of Fungal Allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 129(3), p.181-188.
- Lalande, É., 2010. *L'humidité dans les logements touchait un ménage sur cinq en 2006*, Commissariat général au développement durable. Available at: <http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/LPS61.pdf>.
- Lanier, C., André, V., Séguin, V., Heutte, N., El Kaddoumi, A., Bouchart, V., Picquet, R. & Garon, D., 2012. Recurrence of *Stachybotrys chartarum* during mycological and toxicological study of bioaerosols collected in a dairy cattle shed. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, 19(1), p.61-67.
- Lanier, C., Richard, E., Heutte, N., Picquet, R., Bouchart, V. & Garon, D., 2010. Airborne molds and mycotoxins associated with handling of corn silage and oilseed cakes in agricultural environment. *Atmospheric Environment*, 44(16), p.1980-1986.
- Le Cann, P., Bonvallot, N., Glorennec, P., Deguen, S., Goeury, C. & Le Bot, B., 2011. Indoor environment and children's health: Recent developments in chemical, biological, physical and social aspects. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 215(1), p.1-18.
- Li, D.-W. & Yang, C.S., 2004. Fungal contamination as a major contributor to Sick Building Syndrome. In *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, p. 31-112.
- Lortholary, O., Gangneux, J.-P., Sitbon, K., Lebeau, B., de Monbrison, F., Le Strat, Y., Coignard, B., Dromer, F., et al., 2011. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clinical Microbiology and Infection*, 17(12), p.1882-1889.
- Macher, J.M., 2001. Review of methods to collect settled dust and isolate culturable microorganisms. *Indoor Air*, 11(2), p.99-110.
- Mandin, C., Derbez, M., Lucas, J.-P., Ramalho, O., Grégoire, A., Lethrosne, M., Ribéron, J. & Kirchner, S., 2009. Campagne nationale « Logements » de l'Observatoire de la qualité de l'air intérieur: de la description de la pollution intérieure à sa compréhension. *Pollution atmosphérique*, 204, p.389-393.
- Massin, N. & Kolopp-Sarda, M.-N., 2004. Pathologies pulmonaires d'origine immuno-allergique en milieu professionnel. *Revue Française des Laboratoires*, 2004(361), p.39-46.
- Maurice, S., Le Floch, G., Le Bras-Quéré, M. & Barbier, G., 2011. Improved molecular methods to characterise *Serpula lacrymans* and other Basidiomycetes involved in wood decay. *Journal of Microbiological Methods*, 84(2), p.208-215.

- Mazur, L.J. & Kim, J., 2006. Spectrum of Noninfectious Health Effects From Molds. *Pediatrics*, 118(6), p.e1909-e1926.
- MEDDTL, 2011. *Construire sain Guide à l'usage des maîtres d'ouvrage et maîtres d'oeuvre pour la construction et la rénovation*, Ministère de l'Écologie, du Développement durable, des Transports et du Logement. Available at: http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/guide_construire_sain.pdf.
- Meklin, T., Haugland, R.A., Reponen, T., Varma, Manju, Lummus, Z., Bernstein, D., Wymer, L.J. & Vesper, S.J., 2004. Quantitative PCR analysis of house dust can reveal abnormal mold conditions. *Journal of Environmental Monitoring*, 6(7), p.615.
- Ménard, C., Girard, D., Léon, C. & Beck, F., 2008. *Baromètre santé environnement 2007*, Saint-Denis: INPES. Available at: http://www.inpes.sante.fr/Barometres/BSE2007/pdf/pollution_airint.pdf.
- Mendell, M.J., Mirer, A.G., Cheung, K., Tong, M. & Douwes, J., 2011. Respiratory and allergic health effects of dampness, mold, and dampness-related agents: A review of the epidemiologic evidence. *Environmental Health Perspectives*, 119(6), p.748-756.
- Migueres, M., Dakhil, J., Delageneste, R., Schwartz, C., Pech-Ormières, C., Petit Lévy, I., Pujazon, M.-C., Leneveu, H., et al., 2009. Profils de sensibilisation cutanée aux pneumallergènes des patients consultant pour allergie respiratoire: Enquête prospective sur 505 patients réalisée par le groupe AART (Association Allergologues de la Région Toulousaine). *Revue des Maladies Respiratoires*, 26(5), p.514-520.
- Millon, L., Reboux, G., Bellanger, A.-P., Roussel, S., Sornin, S., Martin, C., Deconinck, E., Dalphin, J.C., et al., 2006. Quantitative measurement of *Stachybotrys chartarum* using real-time PCR in indoor building, agricultural and hospital environments. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 16(4), p.183-188.
- Moularat, S., Hulin, M., Robine, E., Annesi-Maesano, I. & Caillaud, Denis, 2011. Airborne fungal volatile organic compounds in rural and urban dwellings: Detection of mould contamination in 94 homes determined by visual inspection and airborne fungal volatile organic compounds method. *Science of The Total Environment*, 409(11), p.2005-2009.
- Moularat, S., Robine, E., Ramalho, O. & Oturan, M.A., 2008. Detection of fungal development in closed spaces through the determination of specific chemical targets. *Chemosphere*, 72(2), p.224-232.
- Mudarri, D. & Fisk, W.J., 2007. Public health and economic impact of dampness and mold. *Indoor Air*, 17(3), p.226-235.
- Nesa, D., Lortholary, Bouakline, A., Bordes, M., Chandenier, J., Derouin, F. & Gangneux, J.-P., 2001. Comparative performance of impactor air samplers for quantification of fungal contamination. *Journal of Hospital Infection*, 47(2), p.149-155.
- Nicolle, M.C., Lebeau, B., Perraud, M., Berthelot, P., Gari-Toussaint, M., Raberin, H., Thiebaut, A., Piens, M.A., et al., 2002. Surveillance de l'environnement fongique en hématologie : analyse des pratiques de neuf centres hospitaliers et élaboration d'un protocole commun. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 12(1), p.12.

- Nieguitsila, A., Arné, Pascal, Durand, B., Deville, M., Benoît-Valiergue, H., Chermette, R., Cottenot-Latouche, S. & Guillot, J., 2011. Relative efficiencies of two air sampling methods and three culture conditions for the assessment of airborne culturable fungi in a poultry farmhouse in France. *Environmental Research*, 111(2), p.248-253.
- Nielsen, K.F., 2003. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology*, 39(2), p.103-117.
- Niemeier, R.T., Sivasubramani, S.K., Reponen, T. & Grinshpun, S.A., 2006. Assessment of fungal contamination in moldy homes: Comparison of different methods. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 3(5), p.262.
- Nonnenmann, M.W., Coronado, G., Thompson, B., Griffith, W.C., Hanson, J.D., Vesper, S.J. & Faustman, E.M., 2012. Utilizing pyrosequencing and quantitative PCR to characterize fungal populations among house dust samples. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(8), p.2038-2043.
- Normand, A.-C., Vacheyrou, Mallory, Sudre, B., Heederik, D.J.J. & Piarroux, Renaud, 2009. Assessment of dust sampling methods for the study of cultivable-microorganism exposure in stables. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24), p.7617-7623.
- Noss, I., Wouters, I.M., Visser, M., Heederik, D.J.J., Thorne, P.S., Brunekreef, Bert & Doekes, G., 2008. Evaluation of a low-cost electrostatic dust fall collector for indoor air endotoxin exposure assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), p.5621-5627.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobón, A.M., Restrepo, A. & Colombo, A.L., 2010. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, 51(5), p.561 -570.
- OMS, 2011. *Environmental burden of disease associated with inadequate housing. Summary report.*, Available at: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0017/145511/e95004sum.pdf.
- OMS, 2012. *Environmental health inequalities in Europe. Assessment report, WHO Regional Office for Europe*, Available at: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/157969/e96194.pdf.
- OMS, 2009. *WHO Guidelines for indoor air quality, dampness and mould publications, WHO Regional Office for Europe*, Available at: www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0017/43325/E92645.pdf.
- OQAI, 2006. *Campagne nationale Logements - Etat de la qualité de l'air dans les logements français - Rapport final*, Available at: <http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/OQAI.pdf>.
- Pasanen, A.-L., Korpi, A., Kasanen, J.-P. & Pasanen, 1998. Critical aspects on the significance of microbial volatile metabolites as indoor air pollutants. *Environment International*, 24(7), p.703-712.
- Peccia, J. & Hernandez, M., 2006. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review. *Atmospheric Environment*, 40(21), p.3941-3961.

- Peccia, J., Hospodsky, D. & Bibby, K., 2011. New Directions: A revolution in DNA sequencing now allows for the meaningful integration of biology with aerosol science. *Atmospheric Environment*, 45, p.1896-1897.
- Peláez, T., Muñoz, P., Guinea, J., Valerio, M., Giannella, M., Klaassen, C.H.W. & Bouza, E., 2012. Outbreak of invasive aspergillosis after major heart surgery caused by spores in the air of the intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases*, 54(3), p.e24-e31.
- Pitkäranta, M., Meklin, T., Hyvärinen, A., Nevalainen, Aino, Paulin, Lars, Auvinen, Petri, Lignell, U. & Rintala, Helena, 2011. Molecular profiling of fungal communities in moisture damaged buildings before and after remediation - a comparison of culture-dependent and culture-independent methods. *BMC Microbiology*, 11(1), p.235.
- Pitkäranta, M., Meklin, T., Hyvärinen, A., Paulin, L., Auvinen, P., Nevalainen, A. & Rintala, H., 2008. Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), p.233-244.
- Rabinovitch, N., 2012. Household mold as a predictor of asthma risk: Recent progress, limitations, and future directions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(3), p.645-646.
- Radon, K., Danuser, B., Iversen, M., Monso, E., Weber, C., Hartung, J., Donham, K., Palmgren, U., et al., 2002. Air contaminants in different European farming environments. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 9(1), p.41-48.
- Randriamanantany, Z.A., Annesi-Maesano, I., Moreau, D., Raherison, C., Charpin, D., Kopferschmitt, C., Lavaud, F., Taytard, A., et al., 2010. *Alternaria* sensitization and allergic rhinitis with or without asthma in the French Six Cities study. *Allergy*, 65(3), p.368-375.
- Reboux, G., 2006. Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 46(3), p.208-212.
- Reboux, G., Bellanger, A.-P. & Dalphin, J.C., 2011. Contre : les composés organiques volatils d'origine fongique ont un impact sur la santé. *Revue Française d'Allergologie*, 51(3), p.350-353.
- Reboux, G., Bellanger, A.-P., Roussel, S., Grenouillet, F. & Millon, L., 2010. Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées. *Revue des Maladies Respiratoires*, 27(2), p.169-179.
- Reboux, G., Bellanger, A.-P., Roussel, S., Grenouillet, F., Sornin, S., Piarroux, R., Dalphin, J.C. & Millon, L., 2009. Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor Air*, 19(6), p.446-453.
- Reboux, G., Piarroux, R., Mauny, F., Madroszyk, A., Millon, L., Bardonnnet, K. & Dalphin, J.C., 2001. Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(7), p.1534-1539.
- Reboux, G., Roussel, S. & Grenouillet, F., 2006. Moisissures de l'environnement agricole. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 16(4), p.248-262.

- Reponen, T., Lockey, J., Bernstein, D.I., Vesper, S.J., Levin, L., Khurana Hershey, G.K., Zheng, S., Ryan, P., et al., 2012. Infant origins of childhood asthma associated with specific molds. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(3), p.639-644.e5.
- Reponen, T., Singh, U., Schaffer, C., Vesper, S.J., Johansson, E., Adhikari, A., Grinshpun, S.A., Indugula, R., et al., 2010. Visually observed mold and moldy odor versus quantitatively measured microbial exposure in homes. *Science of The Total Environment*, 408(22), p.5565-5574.
- Reponen, T., Vesper, S.J., Levin, L., Johansson, E., Ryan, P., Burkle, J., Grinspun, S.A., Zheng, S., et al., 2011. High environmental relative moldiness index during infancy as a predictor of asthma at 7 years of age. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 107(2), p.120-126.
- Rolland, X., Cornet, P. & Drocourt, J.L., 1999. The ChemScan® RDI: a new in-process control tool combining speed with sensitivity in microbial detection. *Biotechnology International II*, 2, p.309–314.
- Roussel, S., Reboux, G., Dalphin, J.C. & Piarroux, Renaud, 2005. Alvéolites allergiques extrinsèques et exposition aux moisissures. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2005(373), p.51-60.
- Roussel, S., Reboux, G., Millon, L., Parchas, M.-D., Boudih, S., Skana, F., Delaforge, M. & Rakotonirainy, M.S., 2012. Microbiological evaluation of ten French archives and link to occupational symptoms. *Indoor air*, In press.
- Rupp, M.E., Iwen, P.C., Tyner, L.K., Marion, N., Reed, E. & Anderson, J.R., 2008. Routine sampling of air for fungi does not predict risk of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Journal of Hospital Infection*, 68(3), p.270-271.
- Rylander, R. & Lin, 2000. (1→3)-β-d-glucan - relationship to indoor air-related symptoms, allergy and asthma. *Toxicology*, 152(1–3), p.47-52.
- Salo, P.M., Arbes, J., Sever, M., Jaramillo, R., Cohn, R.D., London, S.J. & Zeldin, D.C., 2006. Exposure to *Alternaria alternata* in US homes is associated with asthma symptoms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(4), p.892-898.
- Santucci, R., Meunier, O., Ott, M., Herrmann, F., Freyd, A. & de Blay, F., 2007. Contamination fongique des habitations: bilan de 10 années d'analyses. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 47(6), p.402-408.
- Sautour, M., Edel-Hermann, V., Steinberg, C., Sixt, N., Laurent, J., Dalle, F., Aho, S., Hartemann, P., et al., 2012. *Fusarium* species recovered from the water distribution system of a French university hospital. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 215(3), p.286-292.
- Schleibinger, H., Laussmann, D., Bornehag, C.-G., Eis, D. & Rueden, H., 2008. Microbial volatile organic compounds in the air of moldy and mold-free indoor environments. *Indoor Air*, 18(2), p.113-124.
- Sherif, S.O., Salama, E.E. & Abdel-Wahhab, M.A., 2009. Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212(4), p.347-368.
- Stetzenbach, L.D., Buttner, M.P. & Cruz, P., 2004. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(3), p.170-174.

- Stewart, S., Grinshpun, S., Willeke, K., Terzieva, S., Ulevicius, V. & Donnelly, J., 1995. Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), p.1232-1239.
- Swartz, L.J., Callahan, K.A., Butz, A.M., Rand, C.S., Kanchanaraksa, S., Diette, G.B., Krishnan, J.A., Breysse, P.N., et al., 2004. Methods and issues in conducting a community-based environmental randomized trial. *Environmental Research*, 95(2), p.156-165.
- Thornton, C.R., 2010. Detection of invasive aspergillosis. *Advances in Applied Microbiology*, 70, p.187-216.
- Tischer, C.G. & Heinrich, J., 2012. Exposure assessment of residential mould, fungi and microbial components in relation to children's health: Achievements and challenges. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, In press.
- Trunov, M., Trakumas, S., Willeke, Klaus, Grinshpun, S.A. & Reponen, T., 2001. Collection of bioaerosol particles by impaction: Effect of fungal spore agglomeration and bounce. *Aerosol Science and Technology*, 34(6), p.490.
- Vanhee, L.M.E., Nelis, H.J. & Coenye, T., 2008. Enumeration of airborne bacteria and fungi using solid phase cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 72(1), p.12-19.
- Vanhee, L.M.E., Nelis, H.J. & Coenye, T., 2009. Rapid detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* in environmental air samples using solid-phase cytometry. *Environmental Science & Technology*, 43(9), p.3233-3239.
- Verhoeff, A.P. & Burge, H.A., 1997. Health risk assessment of fungi in home environments. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 78(6), p.544-554; quiz 555-556.
- Verhoeff, A.P., van Wijnen, J.H., van Reenen-Hoekstra, E.S., Samson, R.A., van Strien, R.T. & Brunekreef, B., 1994. Fungal propagules in house dust. II. *Allergy*, 49(7), p.540-547.
- Vesper, S.J., 2011. Traditional mould analysis compared to a DNA-based method of mould analysis. *Critical Reviews In Microbiology*, 37(1), p.15-24.
- Vesper, S.J., McKinstry, C., Bradham, K., Ashley, P., Cox, D., Dewalt, G. & Lin, K.-T., 2009. Screening tools to estimate mold burdens in homes. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 51(1), p.80-86.
- Vesper, S.J., McKinstry, C., Cox, D. & Dewalt, G., 2009. Correlation between ERMI values and other moisture and mold assessments of homes in the American Healthy Homes Survey. *Journal of Urban Health*, 86(6), p.850-860.
- Vesper, S.J., McKinstry, C., Hartmann, C., Neace, M., Yoder, S. & Vesper, 2008. Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), p.180-184.
- Vesper, S.J., McKinstry, C., Haugland, R.A., Iossifova, Y., Lemasters, G., Levin, L., Khurana Hershey, G.K., Villareal, M., et al., 2007. Relative moldiness index as predictor of childhood respiratory illness. *Journal Of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 17(1), p.88-94.
- Vesper, S.J., McKinstry, C., Haugland, R.A., Wymer, L.J., Bradham, K., Ashley, P., Cox, D., Dewalt, G., et al., 2007. Development of an Environmental Relative Moldiness Index

- for US homes. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 49(8), p.829-833.
- Vesper, S.J. & Vesper, 2002. Stachylysin may be a cause of hemorrhaging in humans exposed to *Stachybotrys chartarum*. *Infection and Immunity*, 70(4), p.2065-2069.
- Vesper, S.J., Wymer, L.J., Meklin, T., Varma, M., Stott, R., Richardson, M. & Haugland, R.A., 2005. Comparison of populations of mould species in homes in the UK and USA using mould-specific quantitative PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 41(4), p.367-373.
- Warris, A. & Verweij, P.E., 2005. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 43(S1), p.S59-S65.
- Whyte, W., Green & Albisu, A., 2007. Collection efficiency and design of microbial air samplers. *Journal of Aerosol Science*, 38(1), p.97-110.
- Wu, P.-C., Su, H.-J.J. & Ho, H.-M., 2000. A comparison of sampling media for environmental viable fungi collected in a hospital environment. *Environmental Research*, 82(3), p.253-257.
- Yang, C.S. & Heinsohn, P.A., 2007. *Sampling and analysis of indoor microorganisms*, John Wiley & Sons.
- Yao, M. & Mainelis, G., 2006. Effect of physical and biological parameters on enumeration of bioaerosols by portable microbial impactors. *Journal of Aerosol Science*, 37(11), p.1467-1483.
- Yao, M. & Mainelis, G., 2007. Use of portable microbial samplers for estimating inhalation exposure to viable biological agents. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 17(1), p.31-38.

Annexe 1 : Communications orales

Conférences internationales

Méheust D., Le Cann P., Reponen T., Wymer L., Vesper S., Gangneux J.P., *Fungal concentrations in air samples correlated with Environmental Relative Moldiness Index values in French homes*. American Association for Aerosol Research 31st Annual Conference, Minneapolis, USA, 08 – 12 octobre 2012.

Méheust D., Gangneux J.P., Le Cann P., *Evaluation of a liquid cyclone high-volume air sampler coupled with solid-phase cytometry for the detection and quantification of viable fungi in indoor environments*. Indoor Air Conference, Austin, USA, 05 – 10 juin 2011.

Conférences nationales

Méheust D., Le Cann P., Reponen T., Wymer L., Vesper S., Gangneux J.P., *Utilizing quantitative PCR analysis of fungi and the Environmental Relative Moldiness Index to improve risk assessments of fungal exposures in France*. Rencontres scientifiques du Réseau doctoral en Santé Publique, Paris, France, 15 – 16 mai 2012.

Méheust D., Le Cann P., Reponen T., Wakefield J., Vesper S., Gangneux J.P., *Application of the Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) in Brittany, France*. Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Rennes, France, 10 - 11 mai 2012.

Méheust D., Le Cann P., Gangneux J.P., *Évaluation comparative de biocollecteurs à impaction et des conditions de culture pour la quantification de la contamination fongique de l'air intérieur*, Journées techniques RSEIN/OQAI Les particules dans l'air intérieur, Lille, France, 22 - 23 novembre 2010.

American Association for Aerosol Research 31st Annual Conference
October 8-12, 2012 Minneapolis, Minnesota
Oral communication - The Indoor Microbiome symposium

Fungal Concentrations in Air Samples Correlated with Environmental Relative Moldiness Index Values in French Homes

D. Méheust,^{1,2} P. Le Cann,^{1,2} T. Reponen,³ L. Wymer,⁴ S. Vesper,⁴ J-P. Gangneux^{2,5}

¹ Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP), Rennes, France

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U1085, Institut de Recherche Santé, Environnement & Travail (IRSET), Rennes, France

³ University of Cincinnati, Department of Environmental Health, Cincinnati, USA

⁴ Environmental Protection Agency, Cincinnati, USA

⁵ Centre Hospitalier Universitaire de Rennes (CHU), Université de Rennes 1, France

Exposure to homes with high (fourth quartile) Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) values have been shown to be associated with the development of childhood asthma. The ERMI is derived from the analysis of a dust sample obtained from the living room and bedroom. We determined if aerosol-based measures of fungal contamination were correlated with dust-based ERMI values in Brittany, France dwellings. Dust and air samples were obtained from 40 dwellings and analyzed by quantitative PCR (QPCR) and/or by culturing on malt extract agar (MEA). Dust samples were collected by vacuuming two m² in the living room and two m² in a bedroom for five min each with a MitestTM sampler-fitted vacuum. The Coriolis cyclone collector (Bertin Technologies, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) was used at a flow rate of 300 L/min for 10 minutes to sample air in the living room and bedroom. Airborne microorganisms were sampled in collection liquid with an initial volume of 15 mL. The 36 fungi that make-up the ERMI were analyzed by QPCR in the dust and aliquots of the air samples. Air samples were also analyzed by culturing. ERMI values were correlated with QPCR-based fungal concentrations in air samples in the living room (p<0.001; Kendall's tau =0.438, p concordance 0.719) and bedroom (p=0.028; Kendall's tau =0.212, p concordance 0.606). In addition, the culture data from the Coriolis samples were significantly correlated with the ERMI values in the living room (p=0.002; Kendall's tau =0.313, p concordance 0.656) and bedroom (p=0.001; Kendall's tau =0.344, p concordance 0.672). Some fungal species, such as *Penicillium brevicompactum*, *Cladosporium cladosporioides* and *Wallemia sebi*, were commonly found in both French air and dust samples. Aerosol samples obtained with the Coriolis cyclone collector and analyzed by QPCR or culturing may provide a useful addition to the QPCR analysis of dust in understanding indoor fungal contamination.

Evaluation of a liquid cyclone high-volume air sampler coupled with solid-phase cytometry for the detection and quantification of viable fungi in indoor environments

Delphine Méheust^{1,*}, Jean-Pierre Gangneux² and Pierre Le Cann¹

¹EHESP School of Public Health, Rennes, France

²Mycology Laboratory, Rennes Teaching Hospital & EA 4427 SeRAIC, University Rennes 1, France

*Corresponding email: Delphine.Meheust@ehesp.fr

Keywords: fungal contamination, liquid biocollector, cultural analyses, microbial viability detection, hospital environment

1 Introduction

Indoor fungal contamination is a major source of nosocomial diseases in hospitals (Sherif and Segal, 2010). The aerobiocontamination is thus routinely monitored in order to validate the efficiency of air treatment in wards with high risk patients such as hematology units. We previously compared the performances of impactor air samplers (Gangneux et al. 2006). Limitations of this culture-based technology are notably a long incubation period and the fungal recovery dependence on culture conditions. Viability of a microorganism is an important criterion in hospital environment as it determines its infectivity. In this study we evaluated a combination of two recent technologies for sampling and rapid detection of viable airborne fungi.

2 Materials/Methods

A high volume air sampler, Coriolis (Bertin Technologies, France), was compared to the classical impactor Sampl'Air (AES Chemunex, France) that was previously tested for collection efficiency. This study was performed indoors in field conditions in the Teaching Hospital of Rennes (Brittany, France). Several sites expected to have different densities of airborne microflora were selected as summarized in Table 1. The samplers were placed 3m apart to avoid interference. At the end of the sampling period, devices positions were interchanged. Simultaneously to the 3m³ air collection by Coriolis at 300L/min, two samplings of 500L

were performed with Sampl'Air on malt extract agar Petri dishes (MEA, Merck) at 100L/min.

Table 1. Summary of the air sampling protocol.

Presumed level of fungal contamination	Site sampled (hospital)	No. of samples per sampler	
		Coriolis	Sampl' Air
High	Office	5	10
Medium	Conventional room	10	20
Low	Corridor in hematology unit	10	20
Negative	Room with laminar air flow ^a	10	20

^a Provided with high efficiency particulate air filtration

One third of Coriolis liquid samples (equivalent to 1m³ air) was analyzed by spread plate method on MEA, and one third by cytometry using the ChemScan system (AES Chemunex, France).

In this enzymatic 'viability' staining procedure, samples are filtered through a Fluorassure Integral Filtration Unit to trap micro-organisms which are then treated with reagents to determine their viability. These reagents are based on non-fluorescent substrates that liberate free fluorochrome into the cytoplasm when enzymatically cleaved. In addition to esterase activity, viability staining by fluorescein derivatives is based on the principle that only viable cells, which have an intact cell

membrane, are able to retain and accumulate the fluorescent probe. After filtration, each membrane was incubated at 30°C for 3 hours on an absorbent pad soaked with a pre-labeling buffer to activate the fungal metabolism and optimize the cells for the following labeling step. The appearance of fluorescent events is determined by a solid phase cytometer. Confirmation of the fluorescent event being due to a fungal micro-organism may be carried out by microscopic examination of the filter. For the cultural analyses, MEA Petri dishes were incubated at 25°C and fungal colonies were counted on day 3 and day 5.

Mean values (\pm SD) were calculated for each set of samples. After Shapiro-Wilk normality tests, the Kruskal-Wallis test was used to compare means of spore counts recovered with the three techniques. If a significant difference was observed, data for each technique were then compared with each other, using the Dunn's test.

3 Results

No significant differences were observed in terms of spore recovery between cultures on MEA after Coriolis and Sampl'Air collections at the high and medium presumed levels of fungal contamination (Figure 1).

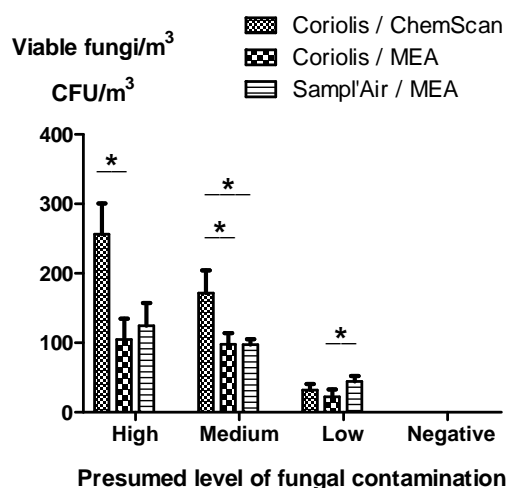


Figure 1. Comparisons of the mean counts obtained with the 2 samplers and the 2 types of analytical methods from air samples collected at different hospital sites. Whiskers indicate SDs. *significant difference ($p < 0.05$).

Significant higher viable fungi collections were observed when the Coriolis samples were examined with solid-phase cytometry by comparison with results of cultures at these contamination levels. Using this liquid cyclonic

sampler and the fluorescence labeling method, results were obtained in real time since the whole procedure took 5h to complete. Besides, air sampling using culture media allowed a non-costly and easy identification of the fungal diversity after macroscopic and microscopic examination but within 3-5 days.

4 Conclusions

By combining the principles of epifluorescence microscopy and flow cytometry, the ChemScan system allows accurate and fast detection of single microbial cells. Besides, this technique provides more information than culture-based methods as it detects also viable but non-cultivable flora. However, a precise identification of a specific fungus is not possible without requiring complementary methods.

The ChemScan system has been previously tested in pharmaceutical industries (Husmann et al. 2000; Smith et al. 2010). In this study, we showed that the combination of this liquid cyclone air sampler and the solid-phase cytometry allow a rapid monitoring of airborne viable fungi in hospital environments. This type of environmental measurement could be thus performed in a hospital surveillance program in order to limit the fungal risk.

5 References

- Gangneux J.P., Robert-Gangneux F., Gicquel G., Tanquerel J.J., Chevrier S., Poisson M., Aupée M. and Guiguen C. 2006. Bacterial and Fungal Counts in Hospital Air: Comparative Yields for 4 Sieve Impactor Air Samplers With 2 Culture Media. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27(12), 1405-1408.
- Husmann K., Wiedemann B. and Steffens K.J. 2000. Detection of airborne viable germs in cleanrooms with a fluorescence marking method. *Pharmazeutische Industrie*, 62(10), 805-811.
- Sherif R. and Segal B.H. 2010. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 16(3), 242-250.
- Smith R., Von Tress M., Tubb C. and Vanhaecke E. 2010. Evaluation of the ScanRDI® as a Rapid Alternative to the Pharmacopoeial Sterility Test Method: Comparison of the Limits of Detection. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 64(4), 356-363.

Annexe 2 : Communications affichées

Conférences internationales

Méheust D., Le Cann P., Reponen T., Vesper S., Gangneux J.P., *DNA-based quantification of mycotoxin producing fungi in Brittany, France*. 2nd European Doctoral College on Environment and Health, Rennes, France, 4 – 6 juin 2012.

Méheust D., Le Cann P., Gangneux J.P., *Comparative evaluation of impactor air samplers and of culture conditions for quantification of fungal contamination*. 1st European Doctoral College on Environment and Health, Rennes, France, 7 – 11 juin 2010.

Conférences nationales

Méheust D., Le Cann P., Gangneux J.P., *Quantification rapide des champignons viables dans les environnements hospitaliers : analyse d'échantillons d'air et de surface par cytométrie en phase solide*. Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Rennes, France, 10 – 11 mai 2012.

Méheust D., Gangneux J.P., Le Cann P., *Evaluation of a liquid cyclone high-volume air sampler coupled with solid-phase cytometry for the detection and quantification of viable fungi in indoor environments*. Rencontres de l'Hôtel Dieu, Paris, France, 12 – 13 mai 2011.

Méheust D., Le Cann P., Gangneux J.P. *Microbiological quality of housing indoor air and respiratory health*. Rencontres de l'Hôtel Dieu, Paris, France, 20 janvier 2010.

Background and objectives: The toxic effects of the ingestion of mycotoxins are quite well known. What is less clear is the role of the inhalation of mycotoxins in water-damaged homes and their effects on human health (Jarvis et al., 2005). Because there are potentially hundreds of indoor mycotoxins, it is not practical to measure all of them and some selection process is needed. We utilized a DNA-based approach, quantitative PCR, to measure 36 common indoor fungi in 40 homes in Brittany, France. Analysis of these 36 fungi resulted in the description of the fungal contamination by a metric called the Environmental Relative Moldiness Index (ERMI) (Vesper, 2011). Potential mycotoxin producing fungi were thus quantified in dust and air samples.

Materials and Methods

Forty dwellings in Brittany were selected for the study: 20 homes with visible mold growth or "moldy" odor and 20 control dwellings. Dust samples were collected by vacuuming 2 m² in the living room and 2 m² in a bedroom for 5 min each with a Mitest™ collector. The Coriolis sampler (Bertin Technologies) was used at a flow rate of 300 L/min to collect two 10-min air samples. Environmental samples were analyzed by Mold Specific Quantitative PCR (MSQPCR) (Vesper, 2011). Culturable fungi concentrations were also determined in air samples by using malt extract agar.

Environmental Relative Moldiness Index

A standardized metric

Difference of fungal concentrations quantified by MSQPCR:

$$ERMI = \sum_{i=1}^{26} \log_{10}(S_{1i}) - \sum_{j=1}^{10} \log_{10}(S_{2j})$$

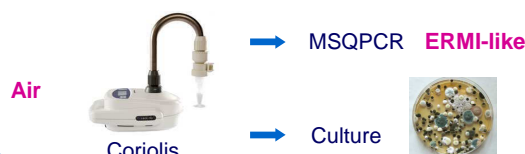
26 fungi associated with water-damaged homes 10 fungi common in all homes (outdoors)

Fungal Exposure Measurement

Sampling



Fungal analysis



MSQPCR ERMI
MSQPCR ERMI-like
Culture

Results and Discussion

The ERMI values in these homes ranged from -2.7 to 28.8 (Figure 1). There was a clear separation of the low-fungal contamination homes with ERMI values (<6) (n=20) from the high ERMI value homes (>8) (n=20). ERMI values were correlated (significant Kendall's tau values) with concentrations of fungi in air samples analyzed by MSQPCR or culturing (data not shown).

By comparing the populations of each mold in high versus low ERMI homes, we found highly significant differences for many fungal species (Table 1). For example, high ERMI homes had a mean concentration of 6 cells of *Stachybotrys chartarum* per mg of dust compared to 1 cell per mg of dust for low ERMI value homes.

Fungus	ERMI <6 Cells/mg dust	ERMI >8 Cells/mg dust	Potential Mycotoxins (Fog Nielsen et al., 2003; Jarvis et al., 2005)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	6	Fumitoxins, gliotoxins
<i>Aspergillus niger</i>	2	6	Ochratoxin A
<i>Aspergillus restrictus</i>	69	2848	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	161	2332	
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	74	
<i>Penicillium brevicompactum</i>	27	693	Mycophenolic acid, Botryodiploidin
<i>Penicillium crustosum</i>	12	136	
<i>Stachybotrys chartarum</i>	1	6	Macrotrichothecenes
<i>Wallemia sebi</i>	138	8684	Wallemiol A et B
<i>Alternaria alternata</i>	2	30	Alternariols
<i>Cladosporium cladosporioides</i> 1	105	2002	Asperentin, Cladosporic acids
<i>Penicillium chrysogenum</i> 2	10	120	Roquefortine C, Chrysogine

Table 1. Comparison of the mean concentrations of fungi in 20 dwellings with ERMI values < 6 versus 20 dwellings with ERMI values > 8. Only species significantly different in concentration shown (p<0.001)

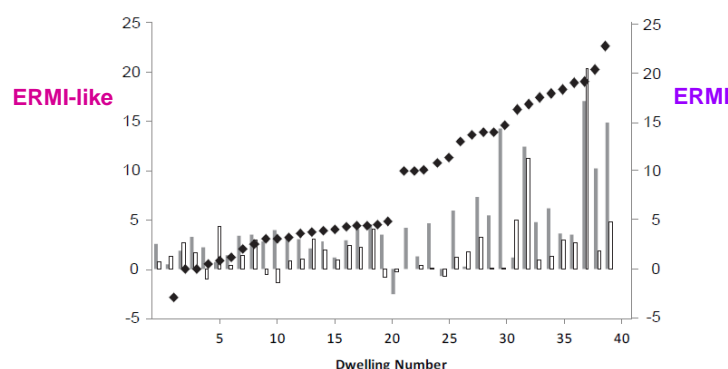


Figure 1. ERMI values for Brittany dwellings assembled from lowest to highest (black diamonds). The ERMI-like values for the living room and bedroom air samples are shown (gray and white columns, respectively).

Conclusion: The ERMI metric was recently used to categorize fungal contaminations in French dwellings (Méheust et al., submitted). Early exposure to molds in US as measured by ERMI was found to significantly increase the risk for asthma at 7 years of age (Reponen et al., 2011). In the present study, this metric provided a practical approach to describing the fungal contamination of possible mycotoxic effects from inhalation exposures. As the MSQPCR analysis of the mycotoxin producing fungi is highly sensitive and specific, it can help targeting the mycotoxins that might be quantified in epi-studies.

References:

- Fog Nielsen, K. 2003 Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet. Biol.* 39(2), 103-117
- Jarvis, B. et al. 2005 Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Appl. Microbiol. Biot.* 66(4), 367-372
- Méheust, D. et al., 2012 Possible application of the environmental relative moldiness index in France. Submitted
- Reponen, T. et al., 2011 High environmental relative moldiness index during infancy as a predictor of asthma at 7 years of age. *Ann. Allerg. Asthma Im.* 107(2), 120-126
- Vesper, S. 2011 Traditional mould analysis compared to a DNA-based method of mould analysis. *Crit. Rev. Microbiol.* 37(1), 15-24

Background and objectives

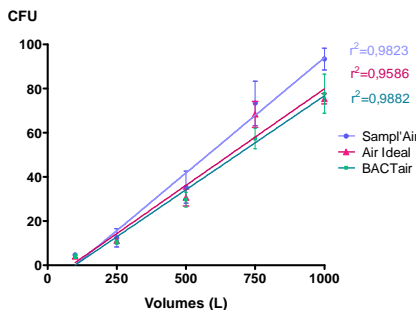
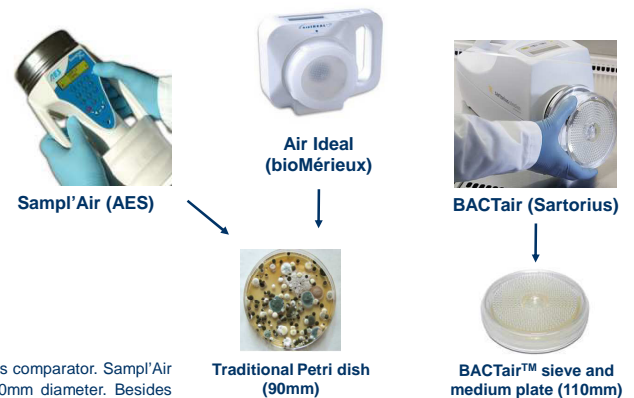
Exposure to fungal propagules in indoor air has been associated with many adverse effects in occupational, hospital and home environments. Portable microbial samplers are suitable instruments for the biological exposure monitoring in these indoor environments. The design of samplers is nevertheless known to influence their efficiencies for measuring airborne fungi concentrations (Yao and Mainelis, 2006; Whyte et al., 2007). Furthermore sampling and culture conditions are crucial factors for the quantification of fungal contamination (Gangneux et al., 2006; Zhen et al., 2009).

The aim of this study was to assess the performance of different impactor air samplers for fungal spore collection and to compare mold recovery efficiencies depending on different culture conditions.

Comparative performance of bioimpactors

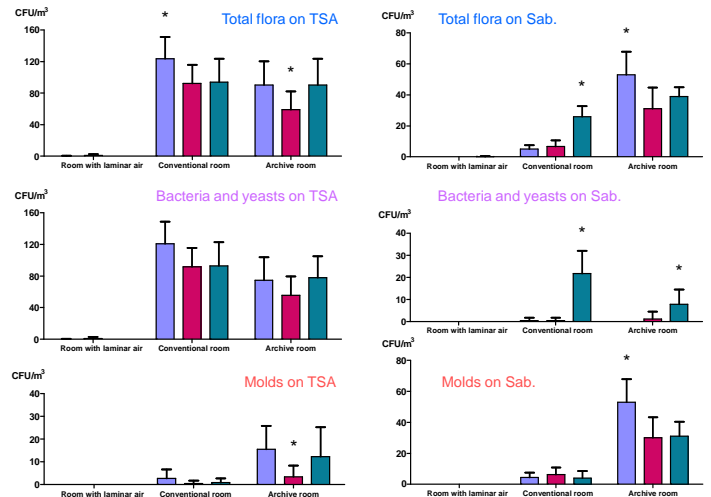
Description of the devices

Two recent bioimpactors were evaluated: Sampl'Air (AES); and BACTair (Sartorius). Air Ideal (bioMérieux) was used as comparator. Sampl'Air and Air Ideal devices share specific characteristics: airflow of 100L/min, impaction on traditional Petri dishes of 90mm diameter. Besides BACTair is characterized by an airflow of 125L/min, and a particular design of the culture medium plate which act also as a sieve of 400 holes.



Linearity

The linearity of the spore recovery was tested depending on the sample air volumes. Three repeats of five different volumes were done in the same room simultaneously with each sampler. Total flora was counted on Sabouraud agar on day 5.



Comparative evaluation for different levels of fungal contamination

Samplers were compared with one another at three different sites with varying levels of contaminated air. The samplers were used simultaneously in 3 locations and were placed 3m apart to avoid interference. At the end of the sampling period, each sampler was moved into the position of one of the other samplers. At each sampling position, 6 samples were seeded on 2 different culture media. Tryptic soy agar Petri dishes (TSA) were incubated for 3 days at 37° C and Sabouraud agar Petri dishes (Sab.) for 5 days at 30° C.

Table 1: Summary of the air sampling protocol

Site sampled (hospital)	Sample volume, L	No. of samples per sampler	
		With tryptic soy agar	With Sabouraud
Room with laminar air flow	1000	9	9
Conventional room	250	9	9
Archive room	100	9	9

Performances of the tested devices were not significantly different at all sampling sites. When using TSA, the total flora recovery was globally better with Sampl'Air and lesser with Air Ideal, mainly due to a significant decrease of mold recovery compared to the other devices. However, Sabouraud agar should be preferred for mold collection, and with this medium, Sampl'Air statistically recovered more molds than other devices. Regarding bacteria and yeasts, the BACTair yielded significantly higher flora. This result is probably due to a different composition of the 2 culture media (traditional Petri dishes and BACTair™ plates).

Effects of culture conditions on mold development

We first analyzed results obtained to compare the efficiencies of mold recovery between TSA and Sabouraud media.

We also compare Malt Extract Agar (MEA), Dichloran Glycerol agar (DG18), and Sabouraud agar for two temperatures of incubation (22° C and 30° C). 9 repeats of 200L air sampling were made with the Sampl'Air device in the same room for each culture conditions.

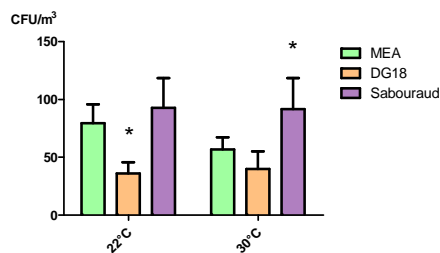
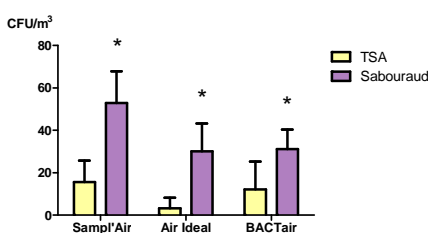


Table 2: Comparison of the mean concentrations + SE of specific fungal groups with 2 different temperatures of incubation (n=9). * Significant difference (p<0.05; Student's t test)

	Total flora			Aspergillus spp.			Penicillium spp.		
	22°C	30°C	p	22°C	30°C	p	22°C	30°C	p
MEA	79.44	56.67	0.003 *	2.78	6.67	0.005 *	10.00	6.11	0.135
DG18	51.67	40.00	0.104	1.67	5.56	0.042 *	12.22	11.67	0.874
Sabouraud	92.78	91.67	0.930	3.89	12.78	0.009 *	10.00	12.78	0.445

ANOVA analysis indicates a significant difference between these media at 22° C. A temperature effect was observed on *Aspergillus* spp. that are more thermophilic than the other fungal genera. Besides, we observed that xerotolerant species, such as *Cladosporium herbarum* and *Wallenia sebi*, are specifically identified on the DG18 agar.

Discussion - Conclusion

On the basis of their performance, autonomy and simplicity of use, we conclude that Sampl'Air and BACTair are suitable for routine indoor evaluation of fungal air contamination. Our results do not support the use of tryptic soy agar for fungal recovery. *Aspergillus* spp. are more enumerated at 30° C than 22° C. This study also reveals that culture conditions need to be adjusted to the fungal group of interest.

References:

- Gangneux, et al. 2006 Bacterial and fungal counts in hospital air: comparative yields for 4 sieve impactor air samplers with 2 culture media, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27, 1405-1408
- Whyte, et al. 2007 Collection efficiency and design of microbial air samplers, *Journal of Aerosol Science*, 38, 97-110
- Yao and Mainelis 2006, Effect of physical and biological parameters on enumeration of bioaerosols by portable microbial impactors, *Journal of Aerosol Science*, 37, 1467-1483
- Zhen et al. 2009 A comparison of the efficiencies of a portable BioStage impactor and a Reuter centrifugal sampler (RCS) High Flow for measuring airborne bacteria and fungi concentrations, *Journal of Aerosol Science*, 40, 503-513

Quantification rapide des champignons viables dans les environnements hospitaliers : Analyse d'échantillons d'air et de surface par cytométrie en phase solide

D. Méheust^{a,b,*}, P. Le Cann^{a,b}, J.P. Gangneux^{b,c}

^a EHESP, LERES – DSET, Rennes ; ^b IRSET ; ^c Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie, CHU Rennes, University Rennes 1

*Auteur correspondant : Delphine.Meheust@ehesp.fr

Contexte et objectifs : L'aérocontamination fongique est une source majeure d'infections acquises dans les hôpitaux (Sherif et Segal, 2010). Afin de valider l'efficacité des systèmes de filtration, l'air intérieur est contrôlé de manière régulière dans les services recevant des patients à haut risque d'infection. Dans des travaux précédents (Gangneux et al., 2006 ; Méheust et al., soumis), nous avons comparé les performances de différents systèmes de collecte par impaction. Le dénombrement fongique est néanmoins dépendant des conditions de culture utilisées, et une longue période d'incubation est nécessaire avec cette technique traditionnelle. La viabilité d'un microorganisme est un paramètre important dans l'environnement hospitalier car il caractérise le risque infectieux. Dans cette étude, nous avons évalué l'intérêt d'une technique de cytométrie à phase solide (CPS) pour quantifier les champignons viables dans des échantillons d'air et de surface. L'apport de cette technologie utilisant un marqueur de viabilité est discuté dans le cadre de la surveillance environnementale dans les établissements de santé.

Matériel et Méthode

Les concentrations fongiques dans l'air ont été déterminées dans des pièces présentant différents niveaux de contamination : un bureau (Fort), une chambre conventionnelle (Moyen), un couloir dans un service d'hématologie (Faible) et une chambre à flux laminaire (Négatif). Dix prélèvements d'air ont été effectués dans chaque pièce avec un biocollecteur cyclonique, Coriolis (Bertin Technologies), à 300L/min pendant 10 min. L'impacteur Samp'l'Air (AES Chemunex) a été utilisé en parallèle pour effectuer vingt prélèvements de 500L d'air à 100L/min. Des prélèvements de surfaces de 100 cm² ont été effectués dans des services du CHU de Rennes. Des écouvillons floqués spécifiques, ChemSwabs (AES Chemunex), ont été comparés à des écouvillons standard en coton. Chaque échantillon environnemental a été analysé par culture sur des géloses à l'extrait de malt (MEA). De plus, les échantillons liquides collectés avec le Coriolis et les échantillons ChemSwabs ont été analysés par CPS en utilisant le système ChemScan (AES Chemunex).

Quantification des champignons viables par cytométrie à phase solide

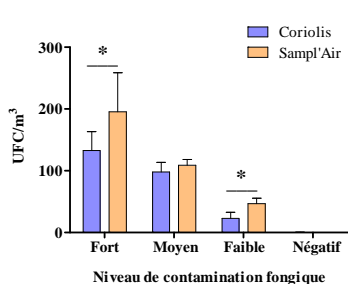
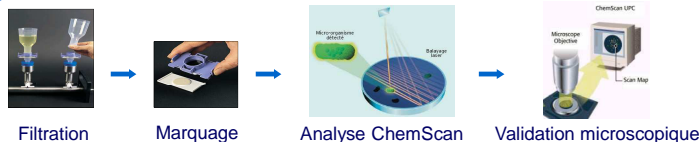


Figure 1. Comparaison des concentrations fongiques moyennes obtenues par culture après prélèvements d'air avec les deux biocollecteurs.
* Différence significative (p<0.05) ANOVA

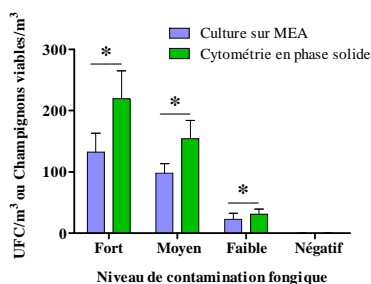
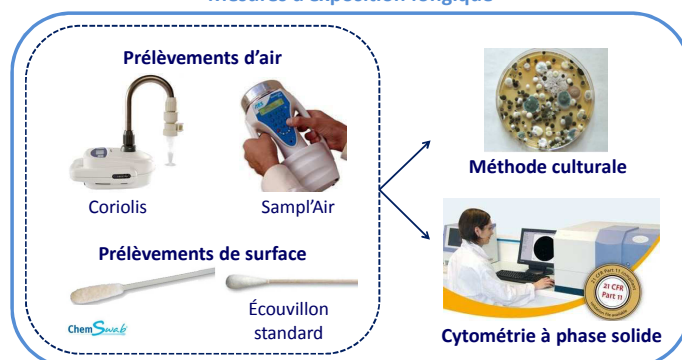


Figure 2. Comparaison des concentrations fongiques moyennes obtenues par culture et par cytométrie après prélèvements d'air avec le Coriolis.
* Différence significative (p<0.05) ANOVA

Mesures d'exposition fongique



Résultats et Discussion

L'impacteur Samp'l'Air a collecté significativement plus de champignons cultivables que l'appareil Coriolis dans deux environnements hospitaliers (Figure 1). Les concentrations fongiques dans l'air obtenues par cytométrie étaient significativement plus importantes que celles déterminées par culture pour les échantillons collectés avec le Coriolis (Figure 2). Le ratio moyen était en effet de 3 champignons viables pour 2 champignons cultivables. Aucune différence significative n'a été observée pour les échantillons de surface (Figure 3). Cependant seuls les écouvillons ChemSwabs permettent une analyse par CPS car ne libèrent pas de débris perturbant le signal. Un des principaux avantages de la CPS est sa rapidité (5 heures versus 5 jours pour la culture).

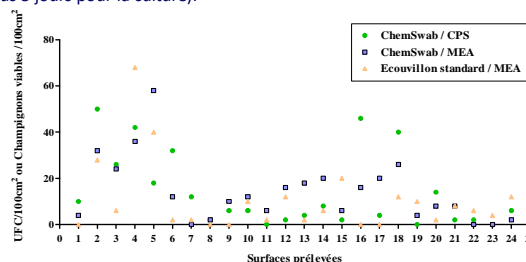


Figure 3. Densités fongiques obtenues par culture sur MEA ou par cytométrie après prélèvements de surfaces avec deux types d'écouvillons.

Conclusion : Cette étude montre l'intérêt de la technique de cytométrie en phase solide pour la surveillance environnementale des champignons viables en milieu hospitalier. L'utilisation de marqueurs de viabilité permet de quantifier toute la flore fongique viable, sans se limiter aux champignons cultivables. En combinant les principes de la microscopie à épifluorescence et de la cytométrie en flux, le système ChemScan permet la détection précise et rapide d'une seule cellule fongique. L'application de cette technologie permet une alerte précoce et la mise en place rapide de mesures correctives dans les hôpitaux. La détection de champignons viables s'avère ainsi un outil approprié pour évaluer le risque infectieux dans des services accueillant des patients immunodéprimés.

References:

Gangneux J.P., et al. 2006 Bacterial and fungal counts in hospital air: comparative yields for 4 sieve impactor air samplers with 2 culture media, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27, 1405-1408
Méheust D., et al. (soumis) Comparative evaluation of three impactor samplers for measuring airborne bacteria and fungi concentrations
Sherif R. and Segal B.H. 2010. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 16(3), 242-250

VU :

Le Directeur de Thèse

VU :

Le Responsable de l'Ecole Doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINEAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury

Résumé

Les moisissures sont des micro-organismes présents dans tous les environnements intérieurs. Les effets sur la santé associés à ces champignons microscopiques sont multiples : irritations, réactions immunoallergiques, infections et effets toxiques. Selon le niveau d'exposition et la vulnérabilité des populations, les moisissures peuvent représenter des risques plus ou moins importants pour la santé publique. Les logements humides et moisis ont par exemple été associés à des maladies chroniques respiratoires telles que l'asthme et les rhinites allergiques. Cependant, le manque d'outils valides permettant d'évaluer quantitativement l'exposition fongique environnementale constitue une des principales difficultés pour mieux appréhender le rôle des particules et des composés fongiques sur la santé humaine. Lors de ce travail de thèse, diverses techniques d'échantillonnage et méthodes d'analyses ont été évaluées afin de mesurer la contamination fongique de l'air, des surfaces et des poussières. Un indice moléculaire basé sur la technique de PCR quantitative a notamment été testé et comparé à d'autres approches pour mesurer l'exposition fongique dans des logements. Après analyse des poussières domestiques collectées au sol, cet indice a permis de discriminer les habitats avec ou sans moisissures visibles. La quantification de groupes fongiques par PCR quantitative s'avère une technique prometteuse pour la mesure de l'exposition aux moisissures dans les environnements intérieurs. Outre le développement et la validation d'outils de mesure, une démarche globale de prévention du risque fongique semble nécessaire, particulièrement chez les populations vulnérables.

Mots clés : moisissures, effets sur la santé, méthodes de mesure, logements

Abstract

Molds are common contaminants in indoor environments. Health effects associated with these microscopic fungi are multiple, including irritations, allergic reactions, infections and toxicity. Depending on the exposure level and the vulnerability of the populations, fungi may represent different public health risks. For example, damp and moldy dwellings are associated with chronic, respiratory diseases such as asthma and allergic rhinitis. However, the lack of valid tools for accurately measuring the environmental fungal exposure is one of the main challenges to better understanding the role of fungal products and particles in human health. In this thesis, diverse sampling techniques and analytical methods were evaluated for measuring the fungal contamination in the air, on surfaces and in settled dust. A quantitative PCR-based index was notably tested and compared with other approaches to assess fungal exposure in dwellings. By collecting and analyzing settled floor dust, this index successfully distinguished between contaminated and non-contaminated homes in Brittany, France. Quantitative PCR and this index are promising techniques for fungal exposure assessment in indoor environments. Further validation of these methods may lead to disease prevention approaches, particularly for vulnerable populations.

Keywords: molds, health effects, measurement methods, homes